



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

***Estudio de la producción de poligalacturonasas de
Aspergillus sojae: producción, caracterización y aplicación
en procesos de vinificación***

Tesista

Lic. Dante Fratebianchi de la Parra

Director

Dr. Sebastián Fernando Cavalitto

Año

2017

El presente trabajo de tesis, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, con el financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Tesista: Lic. Dante Fratebianchi de la Parra

Director: Dr. Sebastián Fernando Cavalitto

Reconocimiento

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme concedido la beca doctoral y por el financiamiento otorgado, lo cual posibilitó el desarrollo de esta Tesis.

A la Universidad Nacional de La Plata, por los fondos a la investigación otorgados, con los que se financió parte del trabajo realizado.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) y a sus autoridades, los Dres. Edgardo Donati y Roque Hours, por haber puesto a mi disposición las instalaciones y el equipamiento del centro para llevar a cabo el trabajo de investigación.

Al Departamento de Ingeniería de Alimentos del Izmir Institute of Technology en İzmir, Turquía, y al Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino así como a la Universidad de La Rioja en Logroño, España, por haberme permitido llevar a cabo pasantías de investigación en sus instituciones y por cubrir, a través del proyecto PGSYS financiado por el programa Marie Curie Actions, los gastos de los viajes y estadías.

Agradecimientos

A Tato, por haberme acompañado durante los últimos 5 años bajo su dirección. Por su buena predisposición, por haberme brindado su confianza, y por aconsejarme y orientarme en los quehaceres científicos cada vez que lo requerí. Pero por sobre todas las cosas, por su comprensión y apoyo en situaciones más allá de lo profesional.

A Iv, de quien espero llevarme al menos una pequeña parte de su enorme pasión por la investigación. Por haberme enseñado a usar equipos y a llevar a cabo un montón de técnicas y procedimientos a lo largo de este período. Por los miles de momentos compartidos, por sus consejos y palabras de aliento.

A Caro, por estar siempre dispuesta a dar una mano desinteresadamente. Por haberme enseñado la técnica de titulación de pectinas y por su ayuda con las cromatografías, la PE y las medidas de viscosidad.

A la Dra. Fernanda Ruiz-Larrea, por transmitirme sus conocimientos relacionados con el mundo de la enología. Por haber planeado los ensayos de vinificación, haberme supervisado de cerca con su desarrollo e incluso haber trabajado a la par conmigo cuando fue necesario.

A Mari y a Juancho, por haber hecho que largas horas de pipeteo sean momentos gratos y divertidos. A Juancho, por su invaluable colaboración.

A Marina, por la gran ayuda brindada con los fermentadores.

A mis compañeros de laboratorio, Ceci, Leo, Tere, Andre, Aldana..., y a todas las personas que han integrado, que han estado de pasada o que hoy forman parte del misceláneo Lab. 1, por los momentos compartidos en el día a día entre laboratorio, boxes y almuerzos.

Al personal del CINDEFI, becarios, técnicos e investigadores, por la buena onda, los mates compartidos y las charlas de pasillo.

A Levent, por todo lo que me ayudó en Turquía con miles de cosas y asuntos de distinta índole. Çok teşekkür ederim!

A Miri, por su colaboración con las determinaciones por HPLC, por haberme dado una mano en la UR, y por su amistad. Y a los chicos del Lab. 229 con los que compartí lindos momentos.

A la cátedra de Microbiología General, por haberme dado la oportunidad de aprender de la docencia. Y por las charlas entre mates y tortas (o facturas, bizcochos, etc., etc...) que muchas veces sirvieron para desconectar y recargar pilas para seguir.

A Andrea, por estar en muchos momentos duros. Por su incesante apoyo y aliento, por su afecto y cariño. Por compartir sus sueños y apostar a transformarlos poco a poco en realidades. Por ayudarme a superar juntos una a una todas las adversidades océano de por medio, las muchas que hemos dejado atrás y las poquitas que quedan.

A mis papás, especialmente, pero también a mis hermanos y mi tío Jorge, por alegrarse con mis logros y apoyarme en los momentos difíciles. Por acompañarme incondicionalmente en cada etapa de mi vida.

Producción científica

Los resultados expuestos en el presente trabajo de tesis han sido publicados en las siguientes revistas científicas:

Capítulo 2

Fratebianchi D, Crespo JM, Tari C, Cavalitto S (2017) Control of agitation rate and aeration for enhanced polygalacturonase production in submerged fermentation by *Aspergillus sojae* using agro-industrial wastes. *J Chem Technol Biotechnol* **92**:305 – 310.

Fratebianchi D, Acosta MA, Cavalitto SF (2017) Harnessing soybean hulls for improved polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* through fine-tuning of ambient pH. *J Chem Technol Biotechnol* DOI:10.1002/jctb.5408.

Capítulo 3

Fratebianchi D, Cavello IA, Cavalitto SF (2017) Purification and Biochemical and Kinetic Properties of an Endo-Polygalacturonase from the Industrial Fungus *Aspergillus sojae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **27**:102 – 109.

Capítulo 4

Fratebianchi D, González M, Tenorio C, Cavalitto SF, Ruiz-Larrea F (2017) Characterization and winemaking application of a novel pectin-degrading enzyme complex from *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Vitis* **56**:85 – 93.

Estadías internacionales

Se realizaron estadías en institutos científicos extranjeros en el marco del proyecto “Bioprocess Platform for the *A. sojae* PGzyme System” (PGSYS), financiado por la Comunidad Económica Europea a través del programa “Marie Curie Actions”.

- ❖ Los estudios de producción de poligalacturonasa por *Aspergillus sojae* en cultivos sumergidos empleando como fuente de carbono y energía pomazas de durazno y damasco, y cáscara de naranja, se llevaron a cabo en el Izmir Institute of Technology (IZTECH) de İzmir, Turquía, bajo la dirección de la Dra. Canan Tari. Los resultados se presentan en el capítulo 2.

- ❖ Los ensayos de vinificación realizados para evaluar el desempeño de un preparado pectolítico de *A. sojae* en relación a la mejora de ciertas etapas del proceso de elaboración de vino blanco y tinto, y también respecto a su capacidad de extracción de polifenoles y aminoácidos que impacten en el producto final, se llevaron a cabo en el Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) de Logroño, España, bajo la dirección de la Dra. Fernanda Ruiz-Larrea. Los resultados se presentan en el capítulo 4.

Tabla de contenidos

Capítulo 1

Introducción general.....	1
La pectina: introducción	3
Elementos estructurales de la pectina	5
Estructura macromolecular de la pectina: modelos.....	11
Pectinasas o enzimas pectolíticas.....	14
Regulación de la síntesis de pectinasas fúngicas.....	23
Aplicaciones industriales de las pectinasas	25
<i>Aspergillus sojae</i>	28
Objetivos	30
Referencias bibliográficas	31

Capítulo 2

Optimización de la producción de poligalacturonasa por <i>Aspergillus sojae</i> en cultivos sumergidos empleando residuos agroindustriales	45
Resumen	46
Introducción.....	47
Materiales y métodos	49
Reactivos	49
Microorganismo y conservación de cepas.....	50
Preparación del inóculo	50
Cultivos en Erlenmeyer agitados	51
Diseños experimentales.....	51
Cultivos en biorreactores de tanque agitado.....	54
Determinaciones analíticas	55
Análisis de imágenes por microscopía.....	58
Resultados y discusión	58

Valoración del potencial de varios subproductos agroindustriales para la producción de PGasa por <i>A. sojae</i>	58
Optimización de la composición del medio en cultivos con cáscara de soja ...	61
Cultivos en biorreactor de tanque agitado empleando cáscaras de soja	78
Estudios de producción de PGasa con cáscaras de naranja y pomaza de durazno y damasco	83
Cultivos en biorreactor de tanque agitado empleando cáscaras de naranja y pomaza de damasco.....	88
Conclusiones.....	93
Referencias bibliográficas	95

Capítulo 3

Purificación y determinación de propiedades bioquímicas y cinéticas de una endo-poligalacturonasa de <i>Aspergillus sojae</i> ATCC 20235.....	101
Resumen	102
Introducción.....	103
Materiales y métodos	104
Reactivos	104
Determinación del grado de esterificación de la pectina	104
Condiciones de cultivo para la producción enzimática	105
Ensayos enzimáticos y determinación de proteínas totales	105
Protocolo de purificación.....	107
Electroforesis	109
Propiedades bioquímicas	110
Determinación de parámetros cinéticos.....	110
Cromatografía en capa fina (CCF)	111
Resultados y discusión	112
Perfil de producción de enzimas pectolíticas de <i>A. sojae</i>	112
Purificación de PGasa de <i>A. sojae</i>	114

Caracterización bioquímica	118
Modo de acción.....	124
Características cinéticas.....	126
Conclusiones	130
Referencias bibliográficas	131

Capítulo 4

Caracterización y aplicaciones vinícolas de un preparado pectolítico de <i>Aspergillus sojae</i> ATCC 20235: clarificación enzimática de mosto de uva blanca para vinificaciones en blanco, y evaluación de la extracción de polifenoles y aminoácidos durante vinificaciones en tinto.....	137
Resumen	138
Introducción.....	139
Materiales y métodos	143
Reactivos	143
Preparación del inóculo y obtención del preparado pectolítico.....	144
Ensayos enzimáticos y determinación de proteínas totales	144
Efecto del SO ₂ en la actividad PGasa y en la estabilidad enzimática	146
Desfangado.....	146
Vinificaciones en blanco	148
Vinificaciones en tinto	149
Análisis químicos.....	150
Análisis cromáticos.....	151
Análisis cromatográficos realizados al vino tinto	152
Análisis Estadísticos.....	153
Resultados y discusión	153
Caracterización de actividades enzimáticas relevantes	153
Clarificación enzimática de mosto de uva blanca	157
Vinificaciones en blanco y composición final	160

Desarrollo del color durante la maceración fermentativa en vinificaciones en tinto.....	164
Composición final de los vinos tintos	167
Composición fenólica y aminoacídica de los vinos tintos	169
Conclusiones.....	174
Referencias bibliográficas	176
Apéndice 1	
Desarrollo de un análisis de componentes principales.....	181
Apéndice 2	
Fundamento teórico del análisis enzimático de los ácidos L-málico y L-láctico	187
Apéndice 3	
Análisis por HPLC: información adicional	189
Capítulo 5	
Conclusiones generales.....	195

Capítulo 1

Introducción general

La pectina: introducción

Uno de los componentes mayoritarios de la pared celular de plantas superiores y, sin duda, también una de las macromoléculas más complejas de la naturaleza es la pectina. Este último atributo se lo ha ganado por ser un polisacárido en cuya estructura pueden encontrarse más de 17 monosacáridos diferentes unidos entre sí por 20 enlaces distintos [Mohnen, 1999; Ridley et al., 2001; O'Neill et al., 2004].

La pectina debe su nombre al químico francés Braconnot, quien al aislarla por primera vez en 1825 y encontrar que gelificaba, sugirió nombrarla “pectina” [Braconnot, 1825], del griego “pektikos” que significa “que coagula, que cuaja”. Sin embargo, la primera información sobre esta sustancia fue provista por Vauquelin en 1790, quien la describió como una sustancia soluble en agua proveniente de las frutas [Vauquelin, 1790]. Esta macromolécula se encuentra mayoritariamente en la lámina media y pared celular primaria de dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas, y es particularmente abundante en ciertas frutas como los cítricos y las manzanas. Aunque en cantidades menores, la pectina también está presente en la pared celular secundaria y en la pared celular primaria de gramíneas. Además de pectina, las paredes celulares se encuentran compuestas por otras dos macromoléculas estructurales importantes, como son la celulosa y la hemicelulosa (Fig. 1.1).

En cuanto a su funcionalidad en plantas, las pectinas, o sustancias pécticas, poseen varias propiedades fisiológicas. Entre ellas se incluyen promover la adhesión célula-célula [Ogawa et al., 2009]; proporcionar soporte estructural en la pared celular primaria; influir en la formación de la pared celular secundaria en fibras y tejidos leñosos [Hongo et al., 2012; Roach et al., 2011; Siedlecka et al., 2008; Singh et al., 2009]; actuar como reservorio de oligosacáridos que cumplen funciones de señalización importantes para el crecimiento de la planta y el desarrollo de respuestas de defensa [Ridley et al., 2001; Savatin et al., 2011]; y promover la captación y liberación de agua para, por ejemplo, incidir en la reología de la pared celular y promover el crecimiento de raíces y semillas [Harholt et al., 2010; Macquet et al., 2007; Young et al., 2008].

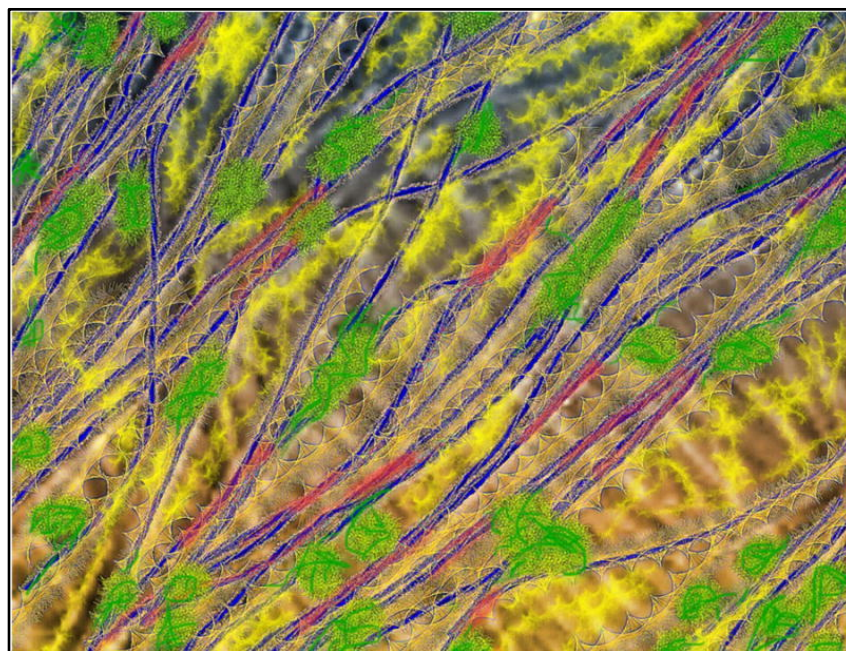


Figura 1.1. Representación de la disposición de la celulosa, xiloglucanos (hemicelulosa) y pectina en la pared celular primaria, basada en resultados recientes. En azul se muestran las microfibrillas de celulosa dispuestas según una imagen obtenida por microscopía de fuerza atómica de la pared celular de una capa superficial de epidermis de cebolla. En rojo se resaltan potenciales sitios de unión entre microfibrillas de celulosa. Los dominios de pectina se señalan en amarillo, mientras que el color verde indica los xiloglucanos, anclados en forma de bobina a la superficie de las microfibrillas [Cosgrove et al., 2014].

Tradicionalmente la pectina se utiliza en la producción de mermeladas y gelatinas de fruta, y en productos con un elevado contenido de azúcar para obtener una textura adecuada del producto [Ciriminna et al., 2015]. A su vez, se emplea como agente espesante y estabilizante en la producción de yogures y jugos de fruta [Laurent & Boulenger, 2003]. También se comercializa como sustituto de grasas y azúcares en varios productos comestibles bajos o libres de grasa, debido a que logra imitar la sensación en boca del azúcar y la textura de la grasa [Ciriminna et al., 2015].

En el sector cosmético y de cuidado personal la pectina se emplea para otorgarle textura a ungüentos, cremas y aceites, así como agente espesante y estabilizante en champús, lociones y tónicos capilares [Ciriminna et al., 2015]. Asimismo, se ha probado que los oligogalacturónidos de pectina actúan como agente anti-edad para la piel, al promover el crecimiento epidérmico, organización y estratificación empleando un modelo *in vitro* con queratinocitos

humanos [Lebreton-Decoster et al., 2011]. En medicina las pectinas se emplean en geles oclusivos o semiocclusivos para el tratamiento de quemaduras y heridas [Mogoşanu & Grumezescu, 2014].

En el área de medicina se ha probado que la pectina, ingrediente natural en alimentos ingeridos normalmente, es beneficiosa para la salud ya que reduce los niveles sanguíneos de colesterol al unirse a éste en el tracto gastrointestinal, y ralentiza la absorción de glucosa mediante su unión a carbohidratos [Wicket et al., 2014]. A su vez, se han realizado varios estudios en los que drogas son encapsuladas con un film de pectina como protección frente a la mucosa gástrica y para permitir una liberación controlada del principio activo al sistema circulatorio [Sriamornsak, 2011].

Elementos estructurales de la pectina

La definición de una estructura macromolecular modelo de la pectina resulta un reto ya que existe una variación estructural considerable, dependiente entre otras cosas del tipo de tejido vegetal y de la etapa de desarrollo de la planta. Sin embargo, se encuentra bastante afianzada la idea de que la pectina contiene esencialmente los mismos elementos estructurales, aunque pueda variar la cantidad o la química fina de los mismos [De Vries et al., 1981; Mc Neill et al., 1979; Schols et al., 1996].

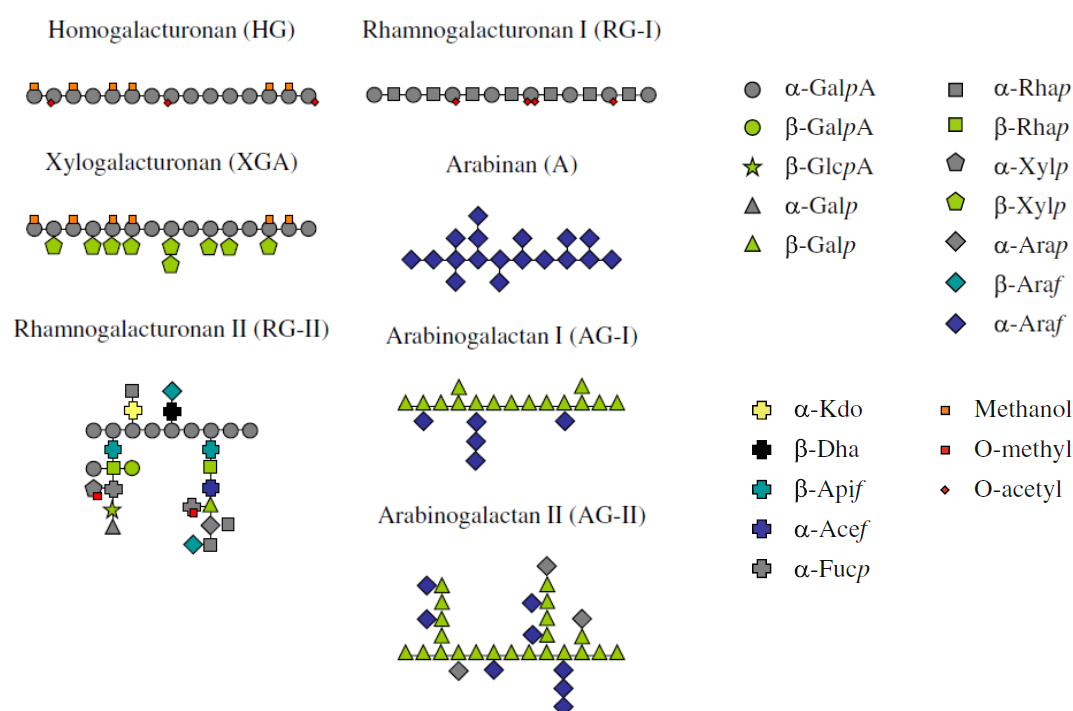


Figura 1.2. Esquema de los diferentes elementos estructurales de la pectina [Bonnin et al., 2014].

El conocimiento actual de la composición de azúcares y enlaces de los elementos estructurales de la pectina proviene mayoritariamente del estudio de la pared celular primaria de tejidos de hojas y frutos, así como de suspensiones celulares. Estos estudios llevaron al conocimiento de la estructura de los polisacáridos representados en la Fig. 1.2, y que se describen a continuación.

Homogalacturonano

Aproximadamente el 65 % de la pectina es homogalacturonano (HG) [Mohnen et al., 2003; O'Neill et al., 1990], haciendo de este polisacárido la sustancia péctica mayoritaria de la pared celular de plantas. Consiste en un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (AGA) unidos por enlaces α -1,4, los cuales pueden o no encontrarse metil-esterificados en el C-6 y/o O-acetilados en el C-2 o C-3 (Fig 1.3 A).

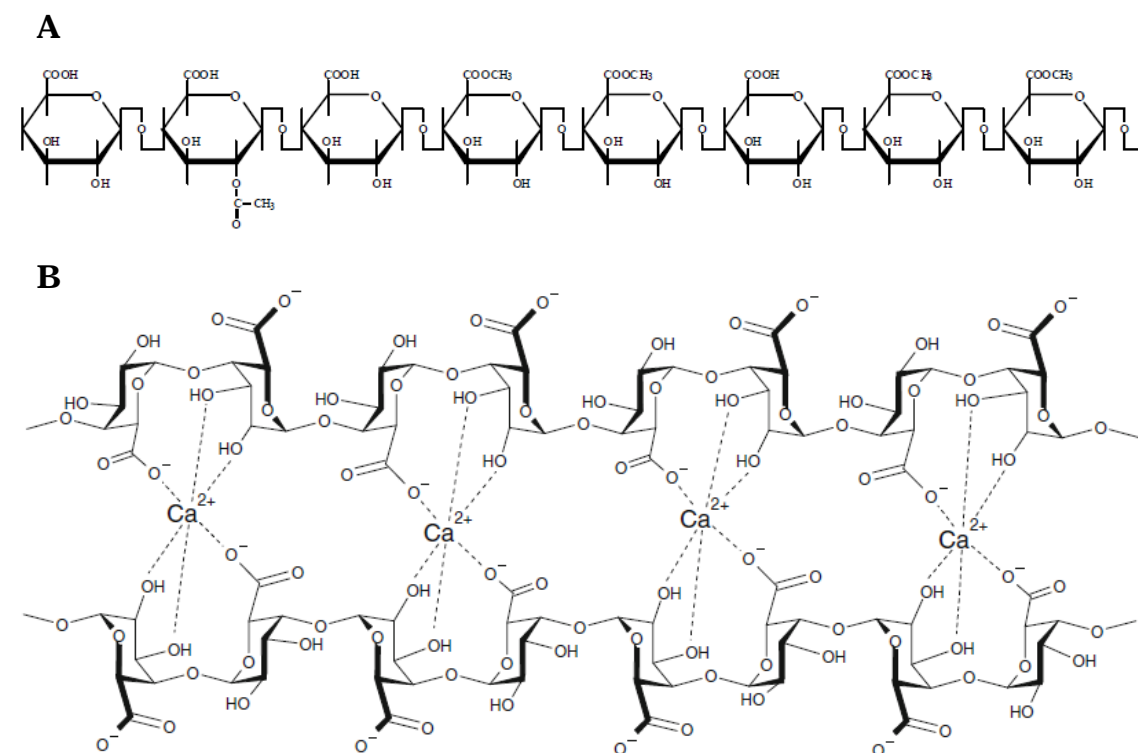


Figura 1.3. (A) Estructura del homogalacturonano con algunos residuos metilados o acetilados. (B) Interacción entre iones Ca^{2+} insertos entre grupos carboxílicos no esterificados de residuos de ácido galacturónico de dos cadenas de homogalacturonano diferentes [Morris et al., 1982].

Se ha determinado a partir de pectinas de varios orígenes que el número de residuos de AGA aproximados en el HG es de entre 70 y 100 [Thibault, 1993]. El

número de residuos de AGA metil-esterificados en el C-6 respecto al número total de residuos de AGA en una molécula de HG se denomina grado de esterificación (GE) y se utiliza para clasificar a las pectinas comerciales en pectinas de alto metoxilo (GE > 50 %) y de bajo metoxilo (GE < 50%). Tanto la cantidad de grupos metil-esterificados como la distribución de los mismos afecta las propiedades físicas de la pectina, pudiendo bloques de 10 o más residuos de AGA no esterificados entrecruzarse mediante uniones con cationes de calcio (Fig. 1.3 B); éstas imparten rigidez a la estructura y conducen a la formación de geles [Morris et al., 1982].

Xilogalacturonano

Puede considerarse que el xilogalacturonano (XGA) es HG sustituido en la posición O-3 de algunos residuos con β -xilosa [Albersheim et al., 1996; Le Goff et al., 2001; Schols et al., 1995]. Se ha encontrado XGA con una molécula de β -xilosa adicional en la posición O-4 de algunos residuos de AGA [Zandleven et al., 2006]. El grado de xilosidación puede variar entre 25 % (sandía) y 75 % (manzana) [Le Goff et al., 2001; Schols et al., 1995]. Parte de los residuos de AGA se encuentran metilesterificados y la distribución de los ésteres metílicos parece ser independiente de si el residuo de AGA se encuentra o no sustituido con xilosa [Schols et al., 1995]. El XGA es más prevalente en tejidos reproductivos (frutos y semillas), aunque también se ha detectado en tallos y hojas de *Arabidopsis* [Zandleven et al., 2007]. Se ha encontrado que un gen involucrado en la ruta biosintética de XGA en *Arabidopsis* se sobreexpresa en respuesta al ataque de patógenos, por lo que una de las funciones del XGA sería hacer que el HG sea una estructura más resistente frente a enzimas de patógenos [Jensen et al., 2008].

Arabinano

Consiste en un esqueleto de residuos de α -L-arabinofurano unidos a través de enlaces α -1,5, y los cuales generalmente están sustituidos en la posición C-2 y/o C-3 con otros residuos de α -L-arabinofurano así como también con dímeros u oligómeros de α -L-arabinofurano (Fig. 1.4, cadena lateral en azul) [Schols et al., 1990; Mohnen, 1999; Ridley et al., 2001].

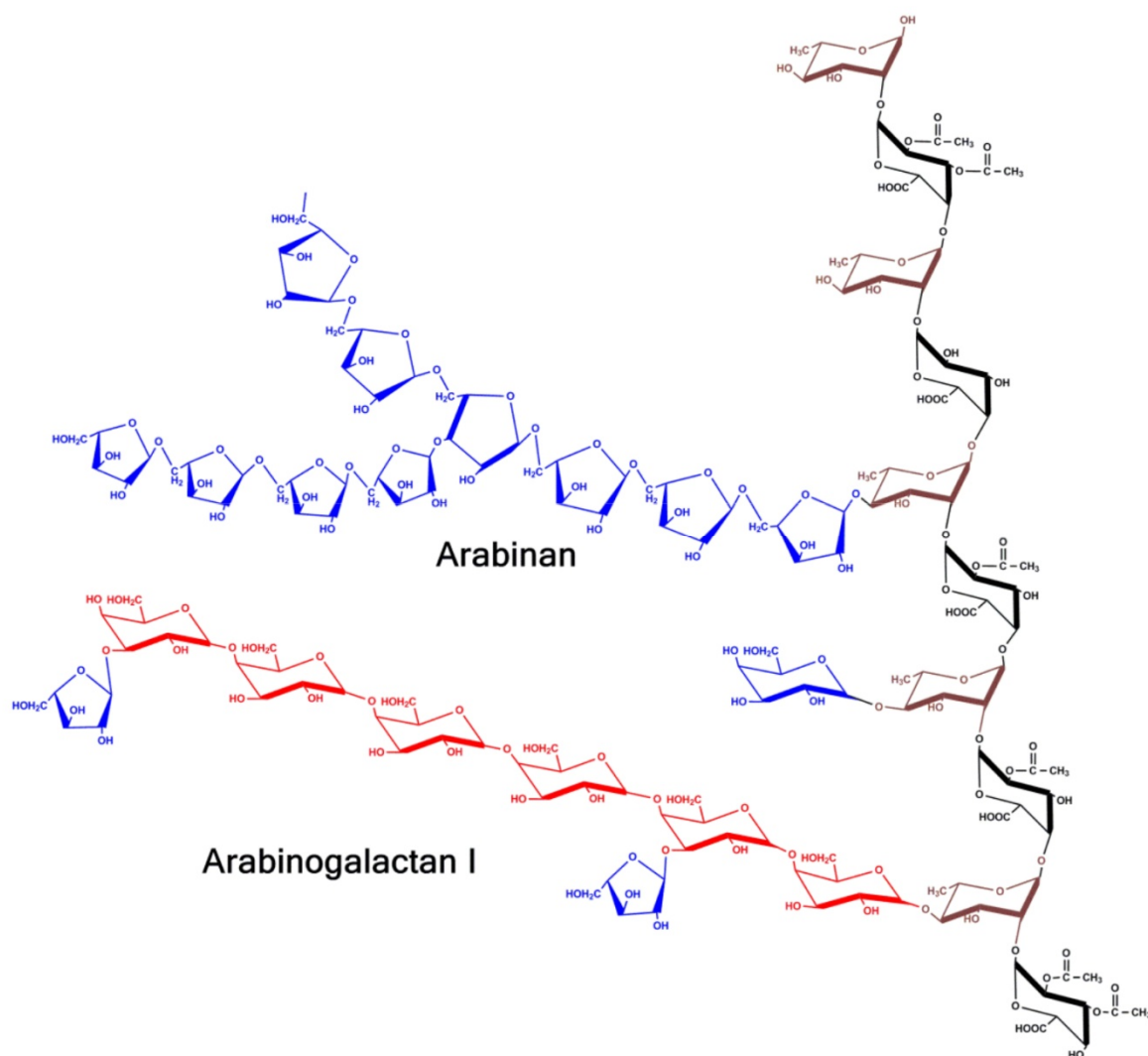


Figura 1.4. Estructura del ramnolacturonano I. El esqueleto compuesto de moléculas de AGA y ramnosa intercaladas se muestra en negro y marrón, respectivamente. En este esquema las moléculas de arabinano y arabinogalactano I están unidas al esqueleto principal a través de residuos de ramnosa [Ochoa-Villareal et al., 2012].

Ramnolacturonano I

El ramnolacturonano I (RGI) representa entre el 20 y el 35 % de la pectina [Mohnen, 2008]. Su esqueleto consiste en repeticiones del disacárido [α -D-AGA-1,2- α -L-ramnosa-1-4-], tal como ilustra la Fig. 1.4. El grado de repetición del disacárido parece ser bastante variable, habiéndose encontrado desde 300 repeticiones en células de sicomoro cultivadas en suspensión [Albersheim et al., 1996; McNeil et al., 1980] hasta 10 repeticiones en pectina extraída de remolacha azucarera, aunque en el último caso no se descarta que el método de extracción por hidrólisis ácida haya degradado los enlaces del esqueleto [Renard et al.,

1995]. Los residuos de AGA pueden estar O-acetilados en C-2 o C3 [Komalavilas & Mort, 1989; Schols et al., 1990; Carpita & Gibeault, 1993; Schols & Voragen, 1994], y existe evidencia de que a su vez en algunas plantas pueden estar metilesterificados [Rihouey et al., 1995]. Algunos residuos de ramnosa están enlazados en las posiciones O-4 u O-3 a azúcares neutros u oligosacáridos neutros lineales y/o ramificados; la proporción de residuos de ramnosa sustituidos respecto al total oscila entre 20-80 % dependiendo del origen del polisacárido [Albersheim et al., 1996]. Si bien se han identificado residuos de α -L-fucosa, ácido β -D-glucurónico y ácido β -D-glucurónico 4-O-metilado en las cadenas laterales de RGI [O'Neill & York, 2003], los sustituyentes descritos usualmente incluyen β -D-1,4-galactosa, α -1,5-arabinano, arabinogalactano I (AGI), arabinogalactano II (AGII) y β -1,4-galactanos [Lau et al., 1987; Lerouge et al., 1993; Nakamura et al., 2002].

Ramnogalacturonano II

Es el dominio estructural más complejo de la pectina y representa cerca de un 10 % de la misma [O'Neill et al., 2004]. Su esqueleto es similar al del HG pero, a diferencia de este último, en el ramnogalacturonano II (RGII) ciertos residuos de AGA se encuentran enlazados covalentemente a cuatro cadenas laterales claramente diferenciadas y altamente conservadas en plantas (Fig. 1.5). Se considera que una unidad estructural de RGII consta de 8 o 9 residuos de AGA, de los cuales 4 están unidos por enlaces α -1,4 a cadenas laterales distintas (A-D) que suman hasta 12 tipos de azúcares diferentes, algunos raros en la naturaleza como apiosa, ácido acérico, ácido 3-desoxi-D-lixo-2-heptulosárico (DHA) y ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO) [Darvill et al., 1978; Spellman et al., 1983; York et al., 1985; Stevenson et al., 1988]. En las paredes celulares de las plantas los dominios de RGII generalmente se encuentran formando complejos con boro a través de residuos de apiofuranosilo, estableciendo un éster borato-diol con otras unidades estructurales de RGII [Ishii et al., 1999]; estas asociaciones son importantes en relación a las propiedades mecánicas de la pared celular primaria [Fleischer et al., 1999] y se ha reportado recientemente que estos puentes de borato son, junto con el Ca^{2+} , indispensables para mantener la ultraestructura de la pectina en mucílago de semillas de *Arabidopsis* [Shi et al., 2017].

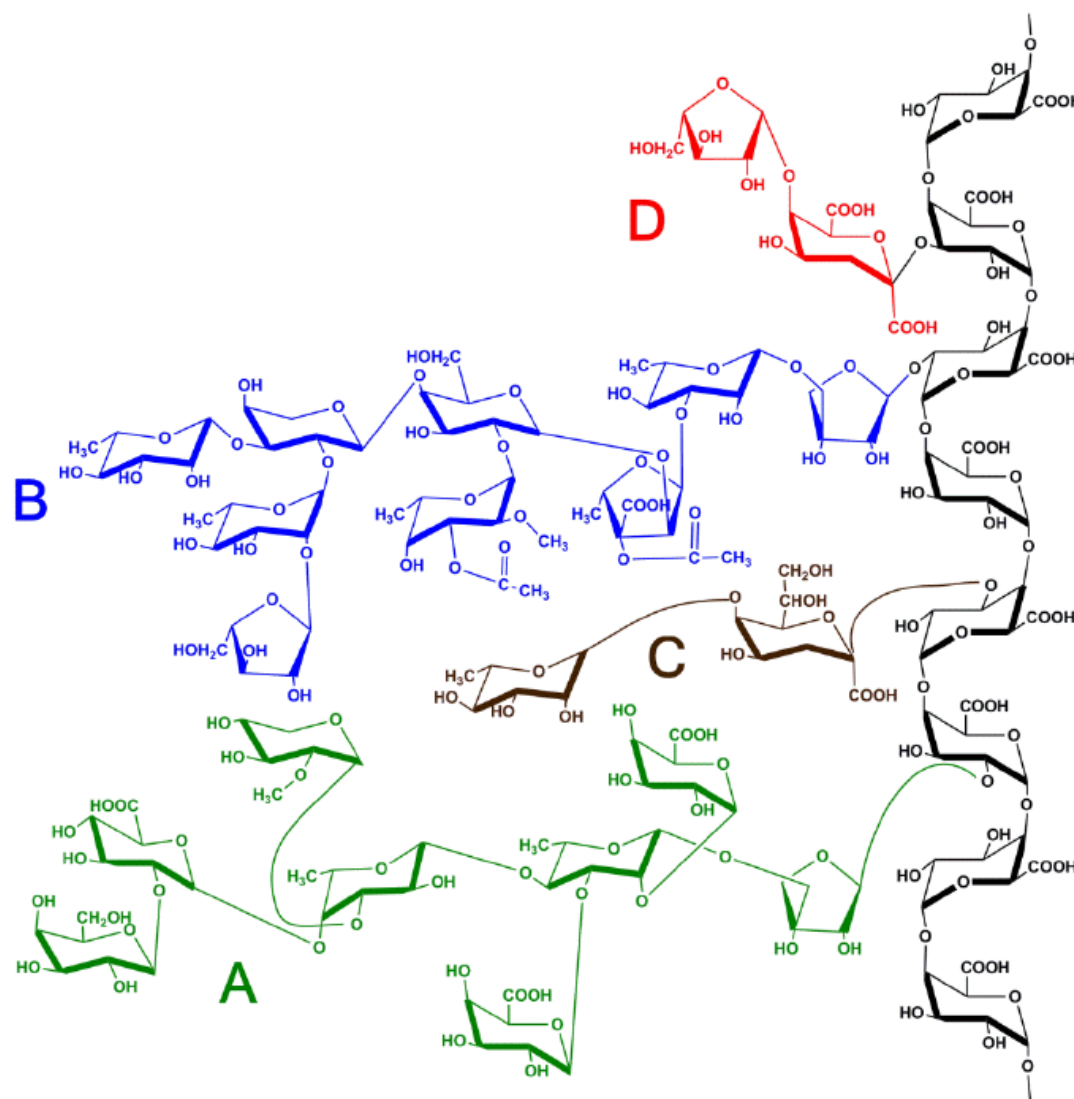


Figura 1.5. Estructura del ramnagalacturonano II. Las cadenas laterales de oligosacáridos (A–D) están representadas con diferentes colores [Ochoa-Villareal et al., 2012].

Arabinogalactano I

El esqueleto de arabinogalactano I (AGI) está compuesto por residuos de D-galactopiranososa enlazados por medio de uniones β -1,4 (Fig. 1.4, cadena lateral en rojo). Las cadenas laterales del AGI consisten en residuos de α -L-arabinofuranosa enlazados a los D-galactosilos en la posición O-3 [Schols et al., 1990; Mohnen, 1999; Ridley et al., 2001], aunque también se han reportado unidos a la posición O-6 [Van de Vis, 1994]. El extremo no reductor del esqueleto del AGI puede finalizar en un residuo de L-arabinopiranososa unida por un enlace α -1,4 [Huisman et al., 2001]. El AGI puede estar esterificado por medio de residuos de galactosa o arabinosa con moléculas de ácido ferúlico; la unión covalente de dos residuos de

ácido ferúlico de las cadenas laterales neutras de la pectina da lugar a entrecruzamientos tanto intra como intermoleculares [Hilz et al., 2007], tal como se ha reportado en pectina de remolacha [Ralet et al., 1994; Oosterveldt et al., 1997; Ralet et al., 2005]. Además de AGI, los “pilares” de estos puentes diferúlicos pueden involucrar otras cadenas laterales neutras como arabinanos [Ralet et al., 2005].

Arabinogalactano II

El arabinogalactano II (AGII) consta de un esqueleto de residuos de D-galactopiranosos unidos por enlaces β -1,3 y presenta cadenas laterales cortas con la siguiente estructura: α -L-Araf-(1 \rightarrow 6)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)] n , donde n puede ser 1, 2 o 3 [Schols et al., 1990; Mohnen, 1999; Ridley et al., 2001]. A su vez, los residuos de galactosilo de las cadenas laterales pueden estar sustituidos con residuos de L-arabinofuranosa enlazados en configuración α -1,3 [Vincken et al., 2003]. El AGII se encuentra generalmente asociado a proteínas, las cuales representan entre un 3 y un 8 % del proteoglicano total y son ricas en prolina/hidroxiprolina, alanina, serina y treonina [Gaspar et al., 2001]. Si bien en un principio no estaba claro que los complejos AGII-proteínas (AGPs) formaran parte de la estructura de la pectina, se ha demostrado que en algunos tejidos vegetales las AGPs se encuentran unidas covalentemente a la pectina [Immerzeel et al., 2006].

Estructura macromolecular de la pectina: modelos

Tal como se mencionaba anteriormente, si bien se conoce con un alto grado de detalle la estructura de los dominios o elementos de la pectina, resulta difícil dilucidar el ensamblaje de estas piezas de forma tal que reproduzcan una estructura macromolecular certera de la pectina en la pared celular. La Fig. 1.6 representa los modelos propuestos hasta la fecha.

Uno de los más difundidos es el que propusieron De Vries et al. [1982], en el cual el esqueleto principal de la pectina consta de una larga cadena de dominios de HG (regiones “lisas”) intercalados con dominios de XGA y RGI con cadenas laterales ricas en arabinanos y presentando AGI (regiones “pilosas”) (Fig. 1.6 A).

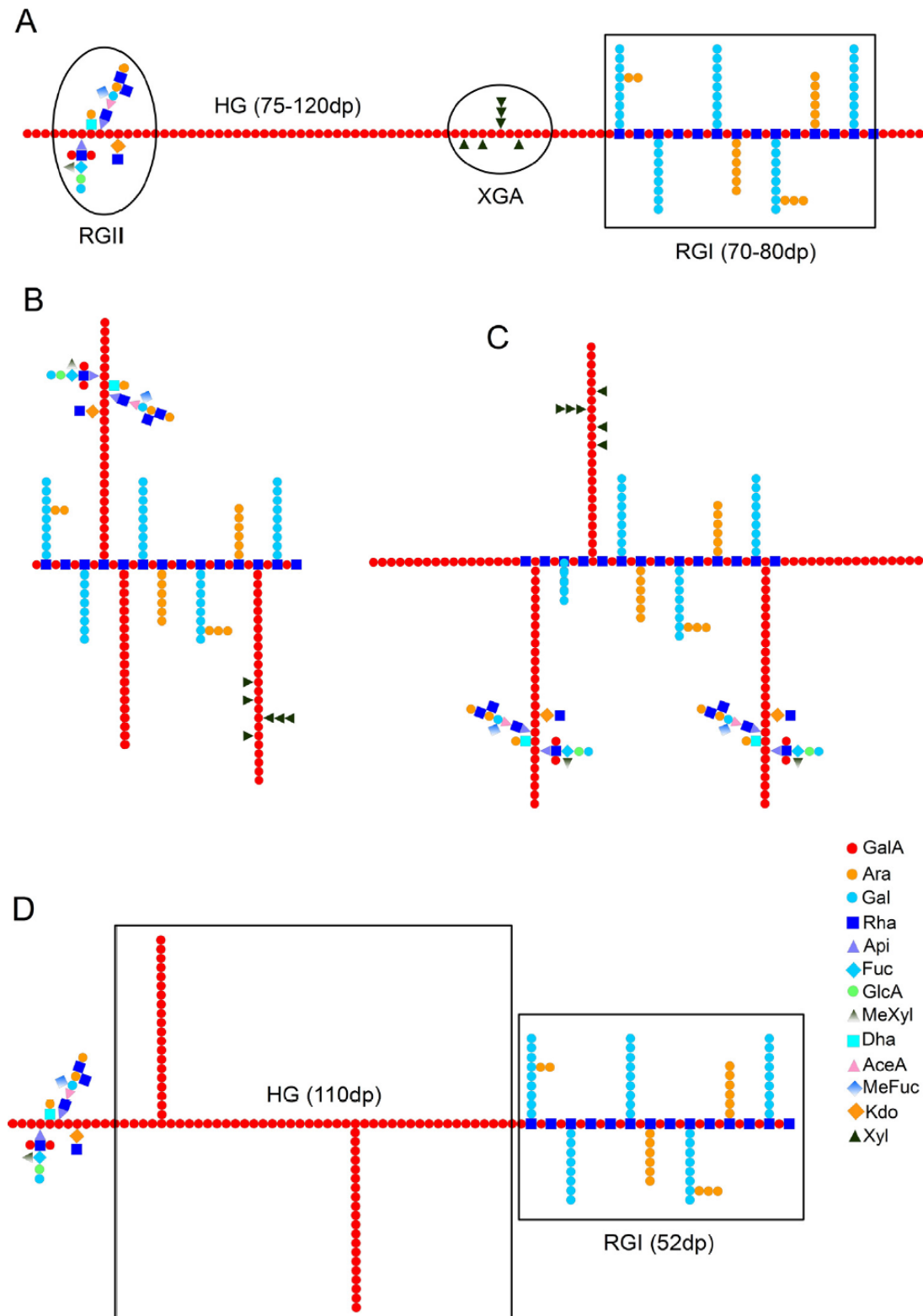


Figura 1.6. Esquema de los distintos modelos de ensamblado de la pectina [Paniagua et al., 2017]. (A) Modelo de regiones “lisas” y “pilosas” propuesto por De Vries et al. [1982]. (B) Modelo sugerido por Vicken et al. [2003], en el cual el RGI es el esqueleto. (C) Modelo según Yapó [2011]. (D) Modelo propuesto por Paniagua et al. [2017]. dp: grado de polimerización.

El número de residuos en ambas regiones puede variar entre 75 y 120 en los dominios de HG, mientras que los de RGI pueden tener entre 70 y 80 unidades. Si bien la posición del RGII en este modelo no fue atendida, este elemento estructural formaría parte de los segmentos de HG, posibilitando así el entrecruzamiento de regiones “lisas” a través de puentes de borato [Ishii & Matsunaga, 2001].

Un modelo alternativo propone que el HG y el XGA serían cadenas laterales enlazadas covalentemente a un esqueleto principal o núcleo de RGI a través de los residuos de AGA o de ramnosa [Vincken et al., 2003] (Fig. 1.6 B). Los resultados de un análisis de los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis ácida de pectina de manzana concordaron en mayor medida con el modelo de regiones “lisas” y “pilosas”, aunque no permitieron desestimar el modelo en el que el RGI constituye el esqueleto principal [Coenen et al., 2007].

Argumentando en base a los resultados de varios estudios que la estructura macromolecular de la pectina en plantas incluiría ambos modelos anteriores o uno aún más complejo, Yapo [2011] propuso un nuevo modelo hipotético cuyo esqueleto se compone de dos bloques de HG unidos a un bloque central de RGI (Fig. 1.6 C). Otros dos bloques de HG serían cadenas laterales enlazadas al núcleo de RGI, las cuales en sus extremos no reductores presentarían elementos de RGII orientados de forma tal que promoverían fácilmente la formación de puentes de borato. Los polisacáridos neutros (AGI, AGII, arabinanos) y el XGA compondrían cadenas laterales unidas covalentemente al RGI, pero ocuparían una posición en el espacio distinta a la de las cadenas laterales de HG.

Recientemente un nuevo modelo fue propuesto en base a resultados del análisis de pectina de frutilla mediante hidrólisis enzimática combinada con microscopía de fuerza atómica [Paniagua et al., 2017], el cual guarda ciertas similitudes con el modelo de regiones “lisas” y “pilosas”. Dicho modelo consta de un esqueleto de dominios de HG, de aproximadamente 110 residuos, intercalados con dominios de RGI con la mitad de residuos que los de HG; el RGII estaría enlazado a los dominios de HG, permitiendo el entrecruzamiento entre moléculas de pectina adyacentes mediante enlaces borato diéster (Fig. 1.6 D). Los bloques de HG del esqueleto no estarían ramificados o presentarían un número bajo de ramificaciones de cadenas laterales de HG.

Pectinasas o enzimas pectolíticas

Dada la complejidad y heterogeneidad de su estructura, el número de enzimas diferentes que actúan sobre la pectina es considerablemente elevado. En muchos microorganismos la producción de estas enzimas se encuentra íntimamente relacionada al proceso de patogénesis y colonización de la planta. La degradación de las sustancias pécticas presentes en la pared celular y lámina media de las plantas mediante la secreción de pectinasas es una de las funciones más tempranas ejercidas por muchos hongos fitopatógenos en el proceso de infección [Collmer & Keen, 1986; Idnurm & Howlett, 2001], y conlleva a la accesibilidad de los demás polisacáridos estructurales como la celulosa y hemicelulosa para la consecuente degradación mediante la acción de celulasas y hemicelulasas [De Lorenzo et al., 1997]. Por otro lado, la acción de las pectinasas endógenas de plantas está asociada a varios procesos biológicos como el crecimiento, la maduración de los frutos y la abscisión de las hojas; todos estos fenómenos emprendidos por las plantas requieren una modificación de sus propias paredes celulares y comienzan por la expansión y separación celular, en donde la estructura de la pectina es el principal blanco a modificar [Tavares et al., 2015].

Las enzimas pectolíticas suelen clasificarse según su modo de acción, pero también acorde a su sitio de acción, es decir, teniendo en cuenta qué elementos estructurales de la pectina actúan como sustrato del biocatalizador. En el primer caso pueden diferenciarse dos grandes grupos: las enzimas desesterificantes, las cuales a su vez se dividen de acuerdo al tipo de enlace éster que atacan (metil-, acetil- o ferul-), y las enzimas depolimerizantes. Dentro de este último grupo hay enzimas que depolimerizan su sustrato por hidrólisis o por β -eliminación, así como también enzimas que atacan enlaces glicosídicos terminales o internos al azar.

A continuación se describirán las pectinasas de acuerdo a un orden que tendrá en cuenta los dominios estructurales blanco de cada enzima.

Enzimas que actúan sobre el HG

GLICOSIDASAS

Endo-poligalacturonasas (endo-PGasas; EC 3.2.1.15): catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,4 entre residuos internos de AGA no esterificados (Fig. 1.7 B). El sitio

de ataque dentro del HG es típicamente aleatorio. Algunos estudios de cinética catalítica con ácido poligalacturónico (HG no esterificado) permitieron revelar que conforme el largo de la cadena disminuye, también lo hacen la velocidad de hidrólisis y la afinidad de la enzima por su sustrato [Parenicová et al., 1998; Benen et al., 1999; Kars et al., 2005; Mertens & Bowman, 2016]. A su vez, el grado de hidrólisis del sustrato disminuye con su grado de esterificación, por lo que la actividad de las endo-PGasas generalmente es óptima frente a ácido poligalacturónico y, al otro lado del espectro, baja frente a pectinas de alto GE. Las endo-PGasas son sintetizadas por una amplia variedad de organismos, incluyendo hongos, bacterias y levaduras [Jayani et al., 2005], así como también plantas superiores y nematodos parásitos de plantas [Sakai et al., 1993].

Exo-poligalacturonasas (exo-PGasas): hidrolizan el mismo tipo de enlace que las endo-PGasas con la salvedad de que actúan sobre uno de los extremos del HG, más específicamente el extremo no reductor. Las hay de tipo I (EC 3.2.1.67) y de tipo II (EC 3.2.1.82), y se diferencian en que las primeras liberan AGA mientras que las últimas producen digalacturonato. Las exo-PGasas de tipo I son producidas típicamente por hongos, en cambio las exo-PGasas de tipo II (también llamadas exo-poli- α -galacturonidasas) provienen generalmente de bacterias [Jayani et al., 2005]; se han reportado a su vez varias exo-PGasas en plantas [Jayani et al., 2005], las cuales, de acuerdo a la caracterización de los productos finales de hidrólisis, parecen ser de tipo I.

Polimetilgalacturonasas (PMGasas): estas enzimas, de confirmarse su existencia, hidrolizarían las uniones α -1,4 entre residuos internos de AGA tal como lo hacen las endo- y exo-PGasas, pero a diferencia de las anteriores preferirían enlaces entre residuos metilesterificados, o al menos hidrolizarían estos enlaces independientemente de la presencia o ausencia de los grupos metiléster. Si bien en varios trabajos se han estudiado actividades PMGasa [Angelova et al., 1998; Singh & Shukla, 1999; Kikot et al., 2010; Mata-Gómez et al., 2015], se trataría realmente de la acción combinada de endo-PGasas con pectinesterasa [Rombouts & Pilnik, 1980]. La existencia de dicha enzima se confirmaría mediante un estudio comparativo de velocidades de reacción de hidrólisis (actividad enzimática) frente a ácido poligalacturónico y pectina de distinto GE, empleando una fracción proteica homogénea con actividad PMGasa.

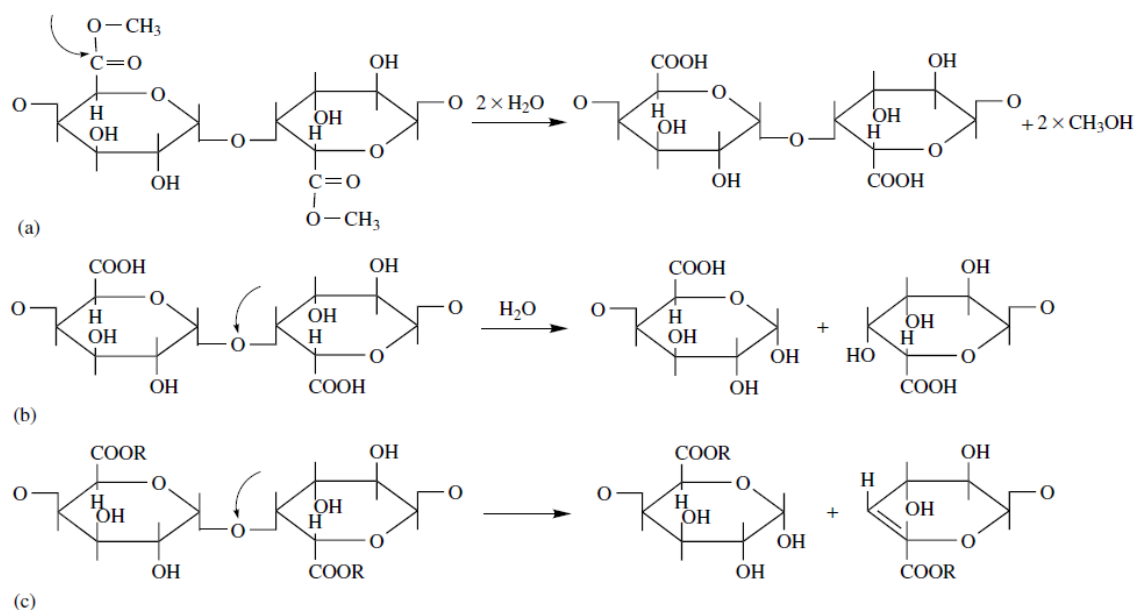


Figura 1.7. Reacciones catalizadas por algunas pectinasas sobre el HG. (a) pectinesterasas, (b) poligalacturonasas y (c) pectin-liasas ($R = \text{CH}_3$) y pectato-liasas ($R = \text{H}$). [Ribéreau-Gayon et al., 2006].

LIASAS

Pectin-liasa (EC 4.2.2.10): catalizan el corte del enlace α -1,4 de entre residuos internos de AGA preferentemente metilesterificados, mediante el mecanismo de β -eliminación, lo cual resulta en la introducción de un doble enlace entre el C-4 y el C-5 del extremo no reductor formado en la reacción (Fig. 1.7 C). Todas las pectin-liasas estudiadas provienen de microorganismos, particularmente de hongos filamentosos, aunque también hay reportes de pectin-liasas de bacterias y levaduras [Yadav et al., 2009]. A la fecha no se han encontrado pectin-liasas en plantas. La presencia de residuos de AGA metilesterificados a ambos lados del sitio de corte no es una condición rigurosa para la biocatálisis, ya que la pectin-liasa acepta como sustrato a residuos parcialmente metilesterificados tanto en el lado reductor como en el no reductor del enlace [Mutenda et al., 2002]. Sin embargo, en cuanto a la acción de esta enzima frente a HG completamente desprovisto de ésteres metílicos (ácido poligalacturónico), una pectin-liasa purificada de *Fusarium oxysporum* no exhibió actividad alguna [Guevara et al., 1996], mientras que su par aislado de *Bacillus clausii* presentó un 20 % de actividad relativa comparando contra pectina [Li et al., 2012].

Endo-pectato-liasas (EC 4.2.2.2): el nombre oficial de estas enzimas es simplemente pectato-liasa. Cortan por β -eliminación las uniones α -1,4 entre

residuos internos de AGA preferentemente no esterificados, generando los oligogalacturónidos 4,5-insaturados en el extremo no reductor (Fig. 1.7 C). A diferencia de las pectin-liasas, para catalizar la reacción requieren la presencia de Ca^{2+} [Marín-Rodríguez et al., 2002] o incluso Fe^{2+} [Hassan et al., 2013]. Han sido aisladas sobre todo de bacterias fitopatógenas, como *Dickeyia dadantii* (antes *Erwinia chrysanthemi*) [Lei et al., 1987; Hassan et al., 2013], y también se ha demostrado su presencia en hongos [Dean & Timberlake, 1989; Benen et al., 2000] y plantas [Domingo et al., 1998; Marín-Rodríguez et al., 2003], en algunas de las cuales estas enzimas son importantes proteínas alergénicas del polen [Taniguchi et al., 1995, Liu et al., 2010]. Adicionalmente, se ha demostrado que parásitos patógenos de plantas también producen esta enzima [Popeijus et al., 2000].

Exo-pectato-liasas: catalizan cortes β -eliminativos desde uno de los extremos de la cadena del sustrato, preferentemente desprovisto de metilésteres. Son enzimas dependientes de la presencia de algún catión divalente, al igual que las endo-pectato-liasas anteriormente descritas.

Dentro de este grupo de enzimas que realizan cortes terminales, las pectato-disacárido-liasas (EC 4.2.2.9) liberan mayoritariamente digalacturonato 4,5-insaturado desde el extremo reductor [Shevchik et al., 1999b; Abbott & Boraston, 2007]. Son enzimas presentes en enterobacterias como *D. dadantii*, *Yersinia enterocolítica*, *Klebsiella* y *Enterobacter* [Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2014]. Aunque las pectato disacárido-liasas de *Y. enterocolítica* y *D. dadantii* son capaces de actuar frente a ácido poligalacturónico, sus sustratos preferentes son, respectivamente, tri- y tetra-galacturonatos [Abbott & Boraston, 2007; Shevchik et al., 1999b].

Las pectato-trisacárido-liasas (EC 4.2.2.22), por otro lado, cortan desde el extremo reductor de la cadena liberando tri-galacturonato 4,5-insaturado como producto mayoritario de reacción. Pueden, aunque en mucha menor medida, liberar di- [Kluszens et al., 2003] o tetra-galacturonato [Berensmeier et al., 2004]. La evidencia experimental pareciera indicar que estas enzimas provienen de bacterias [Kluszens et al., 2003; Berensmeier et al., 2004].

Finalmente, las oligogalacturonato liasas (OGLasas; EC 4.2.2.6) actúan sobre oligogalacturonatos, saturados o insaturados, con una fuerte preferencia por dímeros [Shevchik et al., 1999a]. El producto mayoritario de reacción es el monómero 5-ceto-4-desoxiuronato [Shevchik et al., 1999a]. Su particularidad es

que, a diferencia de la enorme mayoría de las pectinasas, las OGLasas son de localización citoplasmática, y producidas por enterobacterias pectolíticas como *D. dadantii* [Shevchik et al., 1999a] y *Yersinia enterocolítica* [Abbott et al., 2010]. Estas enzimas emplean Mn^{2+} u otro metal de transición (Co^{2+} , Ni^{2+} o Fe^{2+}) como cofactor [Shevchik et al., 1999a; Abbott et al., 2010], lo cual se cree que es debido a la baja concentración de Ca^{2+} en el citoplasma. La acción de la OGLasa en bacterias capaces de usar pectina como fuente única de carbono y energía como *Dickeria* es de suma importancia para la conversión de los productos de reacción de la enzima en 2-ceto-3-desoxigluconato y finalmente piruvato, ingresando así al metabolismo general [Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2014].

ESTERASAS

Pectinesterasa (EC 3.1.1.11): también conocida como pectin-metilesterasa, esta enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces tipo éster en la posición C-6 de los residuos de AGA, liberando metanol y la función carboxílica de cada residuo de la cadena (Fig. 1.7 A). Sintetizadas tanto por hongos y bacterias patógenos de plantas, así como por plantas superiores [Jayani et al., 2005], el modo de acción de las pectinesterasas microbianas es típicamente distinto al de las de plantas: las pectinesterasas fúngicas generalmente desesterifican la pectina en forma aleatoria, mientras que las de plantas lo hacen en bloque o consecutivamente [Ralet et al., 2001; Vita, 2013]. La desesterificación al azar promovería la acción de enzimas depolimerizantes como la endo-PGasa, contribuyendo a la pérdida de la estructura de la pared celular; por otro lado, la liberación en bloque de grupos carboxílicos contribuiría a impartir rigidez a la pared debido a que se posibilita el entrecruzamiento entre dominios de HG a través de puentes de iones Ca^{2+} [Micheli et al., 2001].

Pectin-acetilesterasas (PAEasas; EC 3.1.1.6): hidrolizan los enlaces éster entre los grupos acetilo y los residuos de AGA. Estas enzimas se han aislado y/o caracterizado de la bacterias *D. dadantii* [Shevchik & Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997, 2003] y *Bacillus licheniformis* [Remoroza et al., 2014], el hongo *Aspergillus aculeatus* [Kauppinen et al., 1995; Bonnín et al., 2008], y también de diversas plantas [Williamson, 1991; Bordenave et al., 1995; Christensen et al., 1996; Gou et al., 2012]. Las PAEasas sólo remueven cierta proporción de grupos acetilo respecto al total presente en la pectina, por lo que se ha hipotetizado que, dado que los grupos acetilo se encuentran enlazados a los residuos de AGA en la posición O-2 u O-3, una de las dos posiciones es más fácil de desesterificar que la

otra [Shevchik & Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997; Bonnín et al., 2008]. En este sentido, posteriormente se encontró que la PAE de *B. licheniformis* remueve específicamente los grupos acetilo de la posición O-3 [Remoroza et al., 2014]. A diferencia de las PAEasas bacterianas, las cuales actúan mejor sobre oligómeros de HG desprovistos de grupos metilo, la acción de las PAEasas caracterizadas de *A. aculeatus* es indiferente a la presencia o no de grupos metilo; además, estas últimas son activas sobre grupos acetilo tanto de HG como de RGI [Bonnín et al., 2008].

Enzimas que actúan sobre el XGA

XGA-hidrolasa (no posee EC): reportada por primera vez en *A. tubingensis* [van der Vlugt-Bergmans et al., 2000], esta enzima hidroliza los enlaces α -1,4 entre residuos de AGA preferentemente xilosidados a ambos lados del sitio de corte, aunque también puede actuar entre dos residuos de AGA de los cuales sólo uno está enlazado a xilosa [Zandleven et al., 2005]. La enzima actúa desde el extremo no reductor hacia el extremo reductor del XGA, liberando el disacárido β -D-xilosa-1,3-AGA como producto de reacción predominante [Zandleven et al., 2006].

Enzimas que actúan sobre el esqueleto del RGI

Han sido comparativamente menos estudiadas y gran parte del conocimiento actual proviene de la caracterización del pool de enzimas de *A. aculeatus* activas y específicas para el RGI.

GLICOSIDASAS

RGI-endo-hidrolasas (RGHasas; EC 3.2.1.171): catalizan la hidrólisis de los enlaces internos α -1,2 entre residuos AGA y ramnosa desprovistos de acetil o metil ésteres (Fig. 1.8) [Schols et al., 1990]. La biocatálisis implica una inversión en la configuración anomérica, por lo que se liberan oligosacáridos que presentan β -AGA en el extremo reductor [Pitson et al., 1998]. Todas las RGHasas registradas hasta la fecha provienen de hongos: *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. nidullans*, *Botrytis cinerea* y el basidiomiceto de la pudrición blanca *Irpex lacteus* [Silva et al., 2016].

RGI-exo-hidrolasas: todas estas enzimas hidrolizan enlaces en el extremo no reductor del esqueleto del RGI.

Las RGI-ramnohidrolasas (RGRHasa; EC 3.2.1.174) hidrolizan específicamente el enlace terminal α -L-ramnosa-1,4- α -D-AGA con inversión de configuración anomérica, generando así β -L-ramnosa (Fig. 1.8) [Mutter et al. 1994; Pitson et al.,

1998]. Recientemente otra RGRHasa, producida por *Penicillium chrysogenum*, fue aislada y caracterizada [Matsumoto et al., 2017], constituyendo la segunda enzima documentada de este tipo después de la de *A. aculeatus*.

Por otro lado, la RGI-galacturonohidrolasa (RGGHasa; EC 3.2.1.173) cataliza específicamente la hidrólisis del enlace terminal α -D-AGA-1,2- α -L-ramnosa con inversión de la configuración anomérica, lo que resulta en la liberación de β -D-AGA (Fig. 1.8) [Mutter et al., 1998]. Sólo se ha encontrado en *A. aculeatus* al día de la fecha.

El tercer tipo de hidrolasa de enlaces terminales del RGI es la ramnogalacturonilo insaturado-hidrolasa (URGHHasa, por sus siglas en inglés; EC 3.2.1.72). Provenientes de *B. subtilis*, estas enzimas de localización intracelular son activas únicamente sobre oligómeros de RGI que presentan en su extremo no reductor un residuo insaturado de AGA y por ende actúan sobre el producto de una liasa de RGI (ver más adelante). Consecuentemente, la URGHHasa cataliza la hidrólisis del enlace α -1,2 entre residuos de AGA insaturado y ramnosa, liberando el monómero insaturado de AGA (5-deshidro-4-desoxi-D-galacturonato) [Itoh et al., 2006].

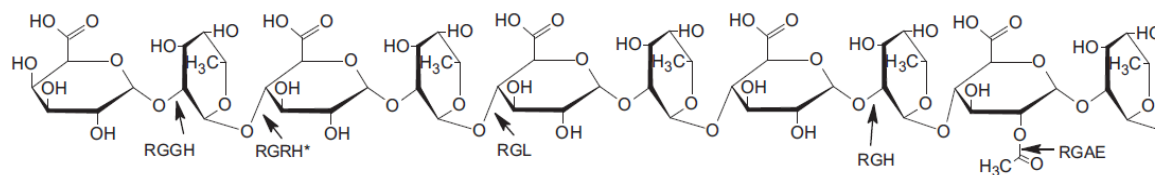


Figura 1.8. Esquema que muestra el sitio de acción de gran parte de las enzimas que degradan el esqueleto del RGI: RGGH (RGI-galacturonohidrolasa), RGRH (RGI-ramnosa hidrolasa), RGL (RGI-endo-liasa), RGH (RGI-endo-hidrolasa), RGAE (RGI-acetilesterasa). *Para que la RGRH actúe, el residuo de ramnosa debe ser terminal y encontrarse en el extremo no reductor. [Silva et al., 2016].

LIASAS

RGI-endo-liasa (RGLasa; EC 4.2.2.23): cortan por β -eliminación los enlaces internos α -1,4 entre residuos de ramnosa y AGA, introduciendo un doble enlace entre el C-4 y C-5 del residuo de AGA del extremo no reductor generado (Fig. 1.8). Además de *A. aculeatus* [Mutter et al., 1996], otros productores documentados de esta enzima son el hongo filamentoso *P. chrysogenum* [Iwai et

al., 2015a] y las bacterias *B. subtilis* [Ochiai et al., 2007] y *D. dadantii* [Laatu & Condemine, 2003], aunque la naturaleza endo- de la enzima de este último microorganismo no ha sido confirmada. Por otra parte, se ha reportado una RGLasa de *Cellvibrio japonicus* (antes *Pseudomonas cellulosa*) específica para RGI no esterificado pero que debe necesariamente contener cadenas laterales de galactosa [McKie et al., 2001].

RGI-exo-liasa (EC 4.2.2.24): cataliza la ruptura por β -eliminación de los enlaces α -1,4 entre residuos de ramnosa y AGA terminales de oligómeros que presentan en su extremo no reductor un residuo de AGA 4,5-insaturado (uAGA), liberando consecuentemente el disacárido uAGA-1,2- α -ramnosa. Esta enzima se identificó por primera vez como proveniente de *B. subtilis* [Ochai et al., 2007] y más recientemente en *P. chrysogenum* [Iwai et al., 2015b], y actúa sinérgicamente con la (endo)RGLasa, empleando como sustrato los productos de degradación de esta última. La RGI-exo-liasa de *P. chrysogenum* es capaz de actuar tanto en presencia como en ausencia de cadenas laterales de galactosa [Iwai et al., 2015b].

ESTERASAS

RGI-acetilesterasa (RGAEasa; EC 3.1.1.86): remueve los grupos acetilo del esqueleto del RGI sin aparente preferencia por el sitio de unión de estos en la cadena principal (Fig. 1.8) [Searle-van Leeuwen et al., 1992 y 1996]. El grado de remoción de grupos acetilo de la RGAEasa de *A. aculeatus* es de alrededor del 70 % respecto del total.

Enzimas que actúan sobre el AGI, AGII y arabinano

Dado que el AGI, AGII y arabinano suelen constituir las cadenas laterales neutras del RGI, las enzimas que degradan estos tres dominios estructurales de la pectina son normalmente denominadas enzimas accesorias. Al catalizar el corte de enlaces internos o terminales de las cadenas laterales, las enzimas accesorias ejercen un efecto sinérgico en la degradación del RGI. Se conoce que estas enzimas son co-expresadas con las enzimas que atacan el esqueleto del RGI tanto en *B. subtilis* [Ochiai et al., 2007] como en varias especies de *Aspergillus*, entre otros microorganismos. Todas las enzimas accesorias conocidas hasta la fecha son hidrolasas y se describen a continuación.

Endo-arabinanasas (EC 3.2.1.99): hidrolizan en forma aleatoria los enlaces α -1,5 internos del arabinano y de las cadenas laterales cortas del AGI [Beldman et al., 1993].

Exo-arabinanasas (no poseen EC): catalizan la hidrólisis del arabinano desde el extremo no reductor, liberando arabinobiosa [Sakamoto & Thibault, 2001] o arabinotriosa [Kaji & Shimokawa, 1984; McKie et al., 1997].

Arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55): liberan por hidrólisis los residuos de arabinosa terminales no reductores, y actúan tanto sobre arabinanos conteniendo enlaces α -1,3 y α -1,5 como sobre AGI [Beldman et al., 1993].

Endo-galactanasas: hidrolizan en forma aleatoria los enlaces entre residuos de galactosa internos de los polisacáridos de galactano.

Las endo- β -1,4-galactanasas (EC 3.2.1.89) hidrolizan los enlaces internos β -1,4 entre residuos de galactosa del AGI [Lahaye et al., 1991]. Por otro lado, las endo- β -1,6-galactanasas (EC 3.2.1.164) actúan sobre los enlaces β -1,6 entre galactopiranosilos, los cuales están presentes en AGII, liberando inicialmente galactooligómeros y finalmente galactosa y galactobiosa [Okemoto et al., 2003]. A su vez, las endo- β -1,3-galactanasas (EC 3.2.1.181) hidrolizan los enlaces internos β -1,3 entre los residuos de galactosa de AGII, liberando galactooligómeros de distintas longitudes en la etapa inicial de reacción [Kotake et al., 2011; Yoshimi et al., 2017].

Exo-galactanasas: hidrolizan los enlaces terminales de los galactanos.

Dentro de este grupo, las exo- β -1,3-galactanasas (EC 3.2.1.145) actúan sobre el AGII mediante la hidrólisis de enlaces β -1,3 desde el extremo no reductor, liberando galactosa en mayor medida y, en menor proporción, 1,6- β -galactobiosa [Tsumuraya et al., 1990; Pellerin & Brillouet, 1994].

Las exo- β -1,4-galactanasas (no poseen EC), en cambio, actúan sobre el AGI hidrolizando los enlaces β -1,4 terminales y liberando galactosa [Nakano et al., 1990; Bonnin et al., 1995; Sakamoto et al., 2013]. Estas enzimas no hidrolizan lactosa ni p- u o-nitrofenil-galactopinósidos, o lo hacen muy lentamente [Sakamoto & Ishimaru, 2013].

β -galactosidasas (EC 3.2.1.23): catalizan la hidrólisis de residuos de β -D-galactosa terminales no reductores de varios β -D-galactósidos de bajo peso molecular, tales como p-nitrofenil- β -D-galactopiranososa, varias agliconas y galactósidos de azúcares distintos de galactosa. Algunas, sin embargo, pueden actuar sobre AGI y AGII [Sakamoto & Ishimaru, 2013].

Feruloil-esterasas (EC 3.1.1.73): remueven el ácido ferúlico enlazado al C-2 de residuos de arabinosa y C-6 de residuos de galactosa del AGI [Sakamoto & Ishimaru, 2013].

Dependiendo de la presencia o no de otros sustituyentes, la degradación completa de los arabinogalactanos, en especial del AGII, requerirá de la acción adicional de las enzimas β -glucuronidasa, β -L-arabinopiranosidasa y α -L-ramnosidasa [Sakamoto & Ishimaru, 2013].

Enzimas que actúan sobre el RGII

La complejidad estructural del RGII, dada por el gran número de azúcares y enlaces glicosídicos distintos que conforman sus cadenas laterales, hace que éste sea blanco de múltiples actividades enzimáticas potenciales. Recientemente Ndeh et al. [2017] demostraron que varias especies del género *Bacteroides*, componentes de la microbiota intestinal normal de humanos, son capaces de degradar y metabolizar el RGII en forma individual. A partir de una de estas especies, *B. thetaiotaomicron*, se descifró el mecanismo por el cual el RGII es degradado, revelando que todos los enlaces del RGII excepto uno son hidrolizados, e identificando y caracterizando a su vez cada una de las enzimas involucradas. Entre ellas hay α -L-ramnosidasas, β -D-galactosidasas, β -L-arabinofuranosidasas, α -L-arabinanasas, 3 enzimas bifuncionales (con dos dominios catalíticos distintos) y actividades enzimáticas novedosas no descritas previamente.

Regulación de la síntesis de pectinasas fúngicas

A pesar de su complejidad estructural, la pectina es degradada por varias especies de *Aspergillus* [de Vries & Visser, 2001; Benoit et al., 2012]. Probablemente los hongos reconozcan la pectina y otros polímeros complejos a través de compuestos de bajo peso molecular derivados de éstos, como monosacáridos o disacáridos. Cuando uno de estos compuestos es detectado por el hongo, ocurre un proceso de señalización que da lugar a la activación de una o más proteínas con el rol de activadores transcripcionales, que en la mayoría de los casos ingresa al núcleo y dispara la transcripción de sus genes blanco, codificantes para enzimas encargadas de degradar los polímeros, así como también enzimas de vías metabólicas necesarias para metabolizar la fuente de carbono disponible [Culleton et al., 2013]. Se cree que las moléculas inductoras se

producen por degradación de los polisacáridos por medio de pequeñas cantidades de enzimas producidas en forma constitutiva [Parenicová et al., 2000; Martínez-Trujillo et al., 2009], aunque otros estudios sugieren que los inductores se liberan por enzimas que se sintetizan en respuesta a la inanición [van Munster et al., 2014; Delmas et al., 2012].

Dentro del género *Aspergillus*, la regulación de la síntesis de pectinasas ha sido extensamente estudiada en *A. niger* y en menor medida en *A. nidulans*. La regulación ocurre fundamentalmente a nivel transcripcional e involucra factores de transcripción, es decir, proteínas reguladoras que se unen a motivos de ADN conservados aguas arriba del codón de iniciación y activan o reprimen la expresión génica. Se reconocen tres grandes sistemas regulatorios: inducción por monómeros de pectina, represión catabólica por glucosa y modulación por pH.

Inducción por monómeros de pectina

Diferentes herramientas bioinformáticas y de transcriptómica han permitido que en los últimos 5 a 7 años se produzcan avances muy importantes en el conocimiento de los factores de transcripción fúngicos involucrados en la regulación de la utilización de pectina. Los factores de transcripción involucrados hasta la fecha en este sistema regulatorio son tres [Kowalczyk et al., 2017]. Por un lado el regulador RhaR, sensible a L-ramnosa, activa la producción de enzimas que degradan esqueleto del RGI [Gruben et al., 2014]. Por otro lado AraR, sensible a L-arabinosa, induce la producción de pectinasas que actúan sobre el arabinano y AGI y II [Battaglia et al., 2011]. Por último, GaaR es el factor de transcripción sensible a AGA que activa la expresión de pectinasas que degradan el esqueleto del HG [Alazi et al., 2016]; adicionalmente, se ha reportado que la expresión de varios genes codificantes para pectinasas se ve afectada por una proteína represora también sensible a AGA, GaaX [Niu et al., 2017], la cual se postula que en ausencia del inductor se encontraría unida a GaaR, impidiendo su activación. Otro estudio reciente reportó que el 2-ceto-3-desoxigalactonato, un producto intermedio de la vía intracelular del catabolismo de AGA, es un posible inductor de la producción de pectinasas que actúan sobre el HG [Alazi et al., 2017].

Represión catabólica por glucosa

Varios estudios han demostrado que la expresión de muchos de los genes codificantes para enzimas pectolíticas, inducibles por AGA, se encuentra reprimida por glucosa [de Vries et al., 2002; Niu et al., 2015] a través del sistema

de represión catabólica mediado por el factor de transcripción CreA/Cre1. En presencia de glucosa, CreA/Cre1 se une a los promotores de sus respectivos genes diana vía un motivo de ADN consenso para reprimir la expresión. El sistema de represión catabólica por glucosa es un sistema regulatorio mucho más universal que la inducción por monómeros de pectina, tal es así que se han encontrado ortólogos de CreA/Cre1 en familias distintas dentro de las divisiones de ascomicetos y basidiomicetos [Benocci et al., 2017].

Modulación por pH

Los hongos se adaptan a cambios en el pH ambiental a través de una red de transducción de señales que deriva en cambios fisiológicos oportunos, tales como la producción de enzimas hidrolíticas específicas. Brevemente, la respuesta de los hongos al pH ocurre a través de las proteínas señalizadoras Pal y el factor de transcripción PacC, ambos altamente conservados en hongos [Rossi et al., 2013]. La forma activa de PacC (PacC²⁷) induce la transcripción de genes expresados en alcalinidad y reprime la transcripción de los genes expresados en condiciones ácidas [Tilburn et al., 1990; Negrete-Urtasun et al., 1999]. Recientemente se describió otro factor de transcripción, PacX, que actúa como represor de PacC [Bussink et al., 2015]. Se ha demostrado que la regulación de la expresión de celulasas y hemicelulasas en muchos ascomicetos se encuentra mediada por PacC (o sus homólogos) [Mello-de-Sousa et al., 2011; He et al., 2014; Kunitake et al., 2016; Antoniêto et al., 2017]. Sin embargo, si bien hay evidencias que apuntan a que PacC modula la expresión de enzimas que degradan específicamente pectina [de Vries & Visser, 2001; Rollins, 2003], resta la realización de estudios confirmatorios.

Aplicaciones industriales de las pectinasas

El primer uso comercial de las pectinasas data de la década de 1930, cuando se utilizaban únicamente para la clarificación del jugo de manzana [Grassin & Coutel, 2009]. Desde mediados del siglo pasado en adelante, las pectinasas se han empleado para varios fines en diversas industrias como la alimentaria, textil y papelería. En 2011 el mercado de pectinasas generaba ingresos que representaban el 5 % de la venta global de enzimas industriales [Alimardani-Theuil et al., 2011]. Esta enzimas (y otras) son producidas principalmente por *A. niger* y *A. oryzae*, debido en gran medida a los elevados niveles de producción de enzimas

hidrolíticas alcanzados con estos hongos filamentosos [Quintanilla et al., 2015]. Dado que el HG es el dominio estructural más abundante de la pectina, las pectinasas más empleadas en aplicaciones industriales son PGasas, petin-lisas y/o pectinesterasas, por ser las enzimas que depolimerizan o modifican el HG y, por ende, las que influyen más fuertemente en la estructura de las sustancias pécticas.

Las industrias de procesamiento de frutas y vegetales, y de extracción de jugos sean probablemente las que requieran mayor volumen de pectinasas, las cuales por regla general deben ser ácidas debido al que el pH de la mayoría de los jugos es menor que 7. Dependiendo del proceso particular, se emplean como agentes macerantes de tejidos vegetales o para ayudar en la clarificación de jugos. En este último caso, una vez prensada la fruta, los coloides, formados por “nubes” de proteínas positivas rodeadas de moléculas de pectina cargadas negativamente, se mantienen en suspensión debido a repulsiones electrostáticas, confiriéndole al jugo un aspecto turbio, lo cual en el caso de jugos de varias frutas es una característica indeseable. Las pectinasas degradan la pectina, desestabilizando los coloides debido a la interacción electrostática resultante que finalmente promueve la precipitación de las partículas.

Particularmente en la maceración de tejidos vegetales se busca que los preparados enzimáticos contengan protopectinasas, término que hace alusión a la capacidad de ciertas endo-pectinasas de solubilizar sustancias pécticas insolubles (protopectina) [Cavalitto et al., 2000]. Durante el proceso de obtención de néctares y purés para infantes, el agregado de protopectinasas que actúan sobre tejidos vegetales de, por ejemplo, zanahoria o morrón, permite la descomposición de la lámina media sin afectar la integridad celular y por ende, la de pigmentos y vitaminas intracelulares beneficiosos para la salud [Pilnik & Rombouts, 1981; Nakamura et al., 1995].

La elaboración de jugos de manzana y de pera, los cuales generalmente se comercializan como líquidos transparentes, es un ejemplo en el que típicamente se aplican pectinasas. Después de que la fruta es triturada y antes del prensado, el agregado de enzimas pectolíticas a la pulpa mejora el rendimiento en jugo y facilita el procesamiento posterior, especialmente evitando problemas en la ultrafiltración. En esta etapa es importante que la actividad protopectinasa sea baja, ya que de lo contrario se obtiene una pasta pegajosa que disminuye el rendimiento del prensado y demanda ciclos más largos de funcionamiento de la prensa [Grassin & Coutel, 2009]. El producto del prensado es generalmente

pasteurizado y recibido en tanques de almacenamiento, en donde, una vez enfriado a menos 45-50° C, se le agregan pectinasas para clarificar el jugo mediante la degradación de la pectina remanente. El jugo resultante se somete a filtración tangencial con equipos de ultrafiltración y el filtrado transparente se concentra o directamente se embotella.

Durante la elaboración de jugos de grosellas y frutillas, o de frutas tropicales como mango, banana, guayaba y ananá, también se utilizan pectinasas con los fines de facilitar el prensado o de clarificar el jugo [Grassin & Coutel, 2009], tal como se explica más arriba para los jugos de manzana y pera.

En el caso de los jugos cítricos, los cuales suelen comercializarse con pulpa, el agregado de pectinasas está dirigido a reducir la viscosidad del jugo para facilitar el proceso de concentrado sin llegar a producir un grado importante de clarificación [Grassin & Coutel, 2009].

Las pectinasas también encuentran aplicaciones en la industria vinícola, en donde su uso proporciona ventajas tecnológicas como una disminución de los tiempos en etapas pre-fermentativas debido a mejoras en procesos de clarificación y prensado, un aumento del rendimiento del jugo de uva, así como otras ventajas relacionadas con incrementos en la extracción pigmentos y de componentes precursores de aromas localizados en la piel de la uva [Ugliano et al., 2009]. El uso de pectinasas en vinificaciones se trata más profundamente en el Capítulo 4.

Como aplicaciones no alimentarias pueden destacarse las textiles y papeleras, en donde se emplean pectinasas alcalinas. Por un lado, en el procesamiento de telas se utilizan para remover el material no celulósico de la superficie del algodón, obteniéndose generalmente rendimientos menores en comparación con el proceso químico con bases fuertes, pero por otro lado, minimizando la contaminación ambiental derivada del efluente; otra ventaja del proceso enzimático respecto del químico es que no afecta las fibras de celulosa del tejido [Mojsov, 2012; Kohli & Gupta, 2015]. Por otro lado, durante la elaboración de papel se emplean pectinasas para degradar sustancias pécticas indeseables que suelen encontrarse junto con las fibras de celulosa y demás materia inorgánica necesarias para la formación de la hoja de papel; las moléculas de pectina cargadas negativamente interaccionan con polímeros catiónicos, agregados con el fin de minimizar la pérdida de fibras durante el drenaje de agua, y reducen la efectividad de éstos como agentes de retención [Reid & Ricard, 2000].

Aspergillus sojae

El género *Aspergillus* se encuentra dentro del filo Ascomycota, el cual abarca especies de ascomicetos teleomorfos (estadio reproductivo sexual), así como especies a las que no se les conoce el teleomorfo y que antiguamente eran agrupadas dentro del taxón Deuteromycota. En base a estudios de filogenia multigénica realizados en los últimos 10 años se concluyó que el género *Aspergillus* acepta actualmente 19 secciones que se acomodan dentro de 4 subgéneros: el homónimo *Aspergillus*, *Fumigati*, *Nidulantes* y *Circumdati* [Houbraken et al., 2014]. Dentro de este último se encuentra la sección *Flavi*, de la que forman parte *A. flavus* y *A. parasiticus*, productores de aflatoxina, así como las especies no-aflatoxigénicas *A. oryzae* y *A. sojae*. Se ha señalado que *A. sojae* y *A. oryzae* son variantes domesticadas de *A. parasiticus* y *A. flavus*, respectivamente [Heerikhuisen et al., 2005; Gibbons et al., 2012], mientras que Kurtzman et al. [1986] proponen que los 4 microorganismos son en realidad variantes de una única especie. Todas ellas pueden ser discriminadas entre sí y con otras especies de la sección *Flavi* mediante un protocolo de seis pasos empleando técnicas moleculares como PCR en tiempo real, análisis de restricción y ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) [Godet & Munaut, 2010].

Los hongos filamentosos de la sección *Flavi* se caracterizan por la producción de cabezas conidiales mono o biseriadas y conidios en una gama de colores que va del amarillo-verdoso al marrón oliva (Fig. 1.9) [Houbraken et al., 2014].

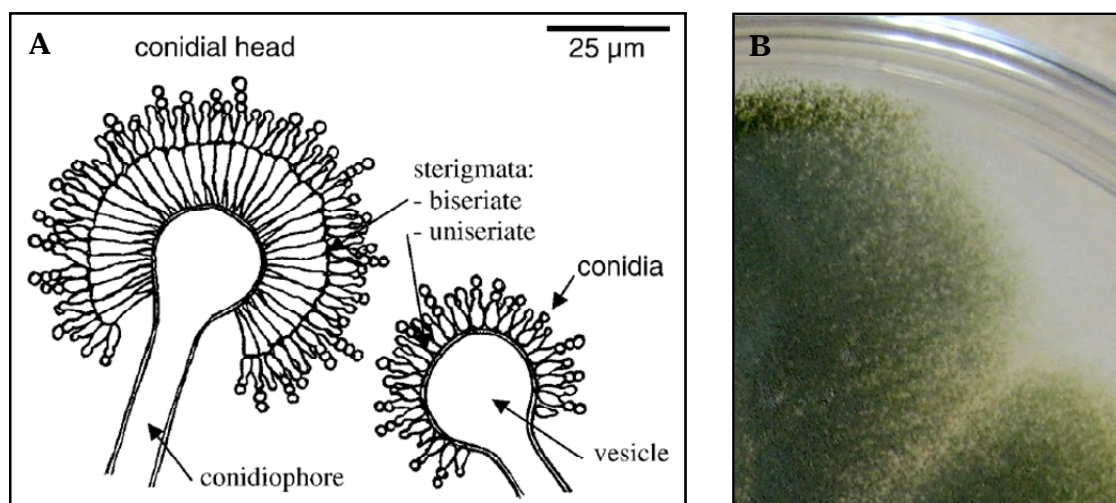


Figura 1.9. (A) Esquema de las estructuras reproductivas asexuales típicas de *Aspergillus* sección *Flavi* [Jørgensen, 2007]. (B) Desarrollo de *A. sojae* en placa de petri.

Al igual que *A. oryzae*, *A. sojae* es un moho del *koji*, y ambos han sido utilizados tradicionalmente en países del este asiático en la elaboración de bebidas y alimentos fermentados. El término *koji* hace alusión a cereales o porotos de soja mohosos, resultantes de la fermentación en sustrato sólido del alimento durante un período de tiempo determinado con *A. sojae* (*koji-kin*), *A. oryzae* (*shoyu-koji-kin*) o ambos [Jørgensen, 2007]. La elaboración de *saké* (bebida alcohólica), *miso* (pasta de cereales o de poroto de soja fermentada) o *shoyu* (salsa de soja) requiere del uso de distintos *koji* como ingredientes [Murakami, 1971].

Muchos aditivos derivados de *Aspergillus* son empleados en la industria alimentaria por ser considerados como seguros por autoridades regulatorias (GRAS, concepto relacionado con el marco legal de seguridad alimentaria estadounidense), y, en ese sentido, la extensa tradición del uso de *A. oryzae* y *A. sojae* en la elaboración de alimentos fermentados indica que son productores adecuados de metabolitos destinados a alimentos y bebidas.

En 1944 Sakaguchi y Yamada aislaron unas cepas características de *Aspergillus* de color amarillo-verdoso a partir de *koji* empleado en la producción de *shoyu*, las cuales depositaron como *A. sojae* en la “American Type of Culture Collection” (ATCC) [Ushijima et al., 2012]. Algunos artículos reportaron acerca del gran potencial de una de estas cepas, *A. sojae* ATCC 20235, como productora de enzimas pectolíticas, particularmente PGasas [Gögus et al., 2006; Ustok et al., 2007]. A partir de estos hallazgos se llevó a cabo un proyecto de cooperación entre la Jacobs University Bremen gGmbH (Bremen, Alemania) y el Izmir Institute of Technology (Izmir, Turquía), el cual fue la semilla de un proyecto a escala global, financiado por la Comunidad Económica Europea a través del programa “Marie Curie Actions”, denominado “Bioprocess Platform for the *A. sojae* PGzyme System” (PGSYS). Este proyecto apuntó a generar una plataforma integral para la biosíntesis, desarrollo y aplicación final del complejo pectolítico de *A. sojae*, particularmente en la industria de alimentos y bebidas. Las partes involucradas (centros de investigación y universidades de países de Latinoamérica y el Mediterráneo) realizaron tareas conjuntas de investigación, con el objetivo de explotar las aptitudes de cada uno.

El presente trabajo de tesis fue realizado en el marco del proyecto PGSYS, y en el mismo se plantearon tareas que abarcan desde el estudio de producción de PGasas, purificación y caracterización del biocatalizador, así como estudios de aplicación en la industria vinícola.

Objetivos

- Alcanzar rendimientos elevados en la producción de PGasa vía el mejoramiento y la optimización de las condiciones de cultivo de *A. sojae* en fermentaciones sumergidas.
- Estudiar la composición del medio y condiciones de cultivo utilizando diseños experimentales y herramientas estadísticas, buscando optimizar la producción de PGasa de *A. sojae*.
- Purificar y caracterizar la/s PGasa/s producidas por el microorganismo (propiedades bioquímicas y cinéticas).
- Estudiar la influencia del cambio en el sistema de producción, de matraces Erlenmeyer a biorreactores de tanque agitado a escala de laboratorio.
- Obtener un preparado pectolítico de *A. sojae* mediante una estrategia adecuada de recuperación del producto y realizar una caracterización de las actividades enzimáticas relevantes para aplicación vinícola.
- Evaluar el desempeño enzimático en procesos de vinificación: estudiar su utilización para mejorar los procesos de clarificación de mosto para elaboración de vinos, así como para incrementar la extracción de pigmentos y otros componentes contenidos en las células de la uva. Realizar una comparación de desempeño contra productos comerciales formulados específicamente para aplicación en vinificaciones.

Referencias bibliográficas

- Abbott DW, Boraston AB (2007) A family 2 pectate lyase displays a rare fold and transition metal-assisted β -elimination. *J Biol Chem* **282**:35328 – 35336.
- Abbott DW, Gilbert HJ, Boraston AB (2010) The active site of oligogalacturonate lyase provides unique insights into cytoplasmic oligogalacturonate β -elimination. *J Biol Chem* **285**:39029 – 39038.
- Alazi E, Khosravi C, Homan TG, du Pré S, Arentshorst M, Di Falco M, ... ,Tsang A (2017) 2-Keto-3-deoxy-L-galactonate mediates the induction of genes involved in D-galacturonic acid utilization in *Aspergillus niger*. *FEBS Lett* **591**:1408 –1418.
- Alazi E, Niu J, Kowalczyk JE, Peng M, Aguilar Pontes MV, Kan JA, Visser J, de Vries RP, Ram AF (2016) The transcriptional activator GaaR of *Aspergillus niger* is required for release and utilization of d-galacturonic acid from pectin. *FEBS Lett* **590**:1804 –1815.
- Albersheim P, Darvill AG, O'Neill MA, Schols HA, Voragen AGJ (1996) pp 47–56 In: Visser J, Voragen AGJ (eds) Pectins and pectinases. Elsevier Science BV, Amsterdam.
- Alimardani-Theuil P, Gainvors-Claisse A, Duchiron F (2011) Yeasts: an attractive source of pectinases—from gene expression to potential applications: a review. *Process Biochem* **46**:1525 –1537.
- Angelova M, Sheremetska P, Lekov M (1998) Enhanced polymethylgalacturonase production from *Aspergillus niger* 26 by calcium alginate immobilisation. *Process Biochem* **33**:299 –305.
- Antoniêto ACC, Pedersoli WR, dos Santos Castro L, da Silva Santos R, da Silva Cruz AH, Nogueira KMV, Silva-Rocha R, Rossi A, Silva RN (2017) Deletion of pH regulator pac-3 affects cellulase and xylanase activity during sugarcane bagasse degradation by *Neurospora crassa*. *PloS One* **12**:e0169796.
- Battaglia E, Visser L, Nijssen A, van Veluw GJ, Wösten HAB, de Vries RP (2011) Analysis of regulation of pentose utilisation in *Aspergillus niger* reveals evolutionary adaptations in Eurotiales. *Stud Mycol* **69**:31 – 38.
- Beldman G, Searle-van Leeuwen MJF, De Ruiter GA, Siliha HA, Voragen AGJ (1993) Degradation of arabinans by arabinanases from *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus niger*. *Carbohydr Polym* **20**:159 – 168.
- Benen JA, Kester HC, Pařenicová L, Visser J (2000). Characterization of *Aspergillus niger* pectate lyase A. *Biochem* **39**:15563–15569.
- Benen JAE, Kester HCM, Visser J (1999) Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I,II and C. *Eur J Biochem* **259**:577– 585.
- Benocci T, Aguilar-Pontes MV, Zhou M, Seiboth B, Vries RP (2017) Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. *Biotechnol Biofuels* **10**:152.

- Benoit I, Coutinho PM, Schols HA, Gerlach JP, Henrissat B, de Vries RP (2012) Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. *BMC genomics* **13**:321.
- Berensmeier S, Singh SA, Meens J, Buchholz K (2004) Cloning of the *pelA* gene from *Bacillus licheniformis* 14A and biochemical characterization of recombinant, thermostable, high-alkaline pectate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**:560–567.
- Bonnin E, Clavurier K, Daniel S, Kauppinen S, Mikkelsen JDM, Thibault JF (2008) Pectin acetyl esterases from *Aspergillus* are able to deacetylate homogalacturonan as well as rhamnogalacturonan. *Carbohydr Polym* **74**:411 – 418.
- Bonnin E, Lahaye M, Vigouroux J, Thibault JF (1995) Preliminary characterization of a new exo- β -(1, 4)-galactanase with transferase activity. *Int J Biol Macromol* **17**:345 – 351.
- Bordenave M, Goldber R, Huet JC, Pernollet JC (1995) A novel protein from mung bean hypocotyl cell walls with acetyl esterase activity. *Phytochemistry* **38**:315–319.
- Braconnot H (1825) Recherches sur un nouvel acide universellement répandu dans tous les végétaux. *Annales de Chimie et de Physique* **28**:173 – 178.
- Bussink HJ, Bignell EM, Múnera-Huertas T, Lucena-Agell D, Scazzocchio C, Espeso EA, ... , Tilburn J (2015) Refining the pH response in *Aspergillus nidulans*: a modulatory triad involving PacX, a novel zinc binuclear cluster protein. *Mol Microbiol* **98**:1051–1072.
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant J* **3**:1 – 30.
- Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF (2000) Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. *J Ind Microbiol Biotechnol* **25**:260 – 265.
- Christensen TMIE, Nielsen JE, Mikkelsen JD (1996) Isolation, characterization and immunolocalization of orange fruit acetyl esterase, pp 723–730. In: Visser J, Voragen AGJ (eds) Pectins and Pectinases. Elsevier Sciences, Amsterdam.
- Ciriminna R, Chavarria-Hernández N, Rodríguez Hernández IA, Pagliaro M (2015) Pectin: a new perspective from the biorefinery standpoint. *Biofuels, Bioprod Biorefin* **9**:368 – 377.
- Coenen GJ, Bakx EJ, Verhoef RP, Schols HA, Voragen AGJ (2007) Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydr Polym* **70**:224 – 235.
- Collmer A, Keen NT (1986) The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **24**:383 – 409.
- Cosgrove DJ (2014) Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Curr Opin Plant Biol* **22**:122 – 131.

- Culleton H, McKie V, de Vries RP (2013) Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: what have we learned from *Aspergillus*? *Biotechnol J* **8**:884 – 894.
- Darvill AG, McNeil M, Albersheim P (1978) Structure of Plant Cell Walls. VIII. A New Pectic Polysaccharide. *Plant Physiol* **62**:418 – 422.
- De Lorenzo G, Castoria R, Bellincampi D, Cervone F (1997) Fungal invasion enzymes and their inhibition, pp. 61-83. In: Carrol GC, Tudzynski P (eds) *Plant Relationships The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*, vol 5, Springer. Berlin, Heidelberg.
- de Vries RP, Jansen J, Aguilar G, Pařenicová L, Joosten V, Wulfert F, Benen JAE, Visser J (2002) Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. *FEBS Lett* **530**:41 – 47.
- De Vries JA, Rombouts FM, Voragen AGJ, Pilnik W (1982) Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydr Polym* **2**:25 – 33.
- de Vries RP, Visser J (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**:497 – 522.
- De Vries JA, Voragen AGJ, Rombouts FM, Pilnik W (1981) Extraction and purification of pectins from alcohol insoluble solids from ripe and unripe apples *Carbohydr Polym* **1**:117 – 127.
- Dean RA, Timberlake WE (1989) Regulation of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase gene (peIA). *The Plant Cell* **1**:275 – 284.
- Delmas S, Pullan ST, Gaddipati S, Kokolski M, Malla S, Blythe MJ, ... ,Archer DB (2012) Uncovering the genome-wide transcriptional responses of the filamentous fungus *Aspergillus niger* to lignocellulose using RNA sequencing. *PLoS Genet* **8**:e1002875.
- Domingo C, Roberts K, Stacey NJ, Connerton IAN, Ruíz-Teran F, McCann MC (1998) A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible. *The Plant J* **13**:17–28.
- Fleischer A, O'Neill MA, Ehwald R (1999) The pore size of non-graminaceous plant cell wall is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan-II. *Plant Physiol* **121**:829 – 838.
- Gaspar Y, Johnson KL, McKenna JA, Bacic A, Schultz CJ (2001) The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol Biol* **47**:161 –176.
- Gibbons JG, Salichos L, Slot JC, Rinker DC, McGary KL, King JG, ..., Rokas A (2012) The evolutionary imprint of domestication on genome variation and function of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Curr Biol* **22**:1403 – 1409.
- Godet M, Munaut F (2010) Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS Microbiol Lett* **304**:157 –168.
- Göğus N, Tari C, Oncü S, Unluturk S, Tokatli F (2006) Relationship between morphology, rheology and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 in submerged cultures. *Biochem Eng J* **32**:171 – 178.

- Gou JY, Miller LM, Hou G, Yu XH, Chen XY, Liu CJ (2012) Acetylsterase-mediated deacetylation of pectin impairs cell elongation, pollen germination, and plant reproduction. *The Plant Cell* **24**:50 – 65.
- Grassin C, Coutel Y (2009) Enzymes in fruit and vegetable processing and juice extraction, pp 236–263. In: Whitehurst RJ, Van Oort M (eds) *Enzymes in Food Technology*. Wiley, Chichester (UK).
- Gruben BS, Zhou M, Wiebenga A, Ballering J, Overkamp KM, Punt PJ, De Vries RP (2014) *Aspergillus niger* RhaR, a regulator involved in L-rhamnose release and catabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**:5531 – 5540.
- Guevara MA, Gonzalez-Jaen MT, Estevez P (1996) Pectin lyase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*: purification and characterization. *Prog Biotechnol* **14**:747 – 760.
- Harholt J, Suttangkakul A, Scheller HV (2010) Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol* **153**:384 – 395.
- Hassan S, Shevchik VE, Robert X, Hugouvieux-Cotte-Pattat, N (2013) PelN is a new pectate lyase of *Dickeya dadantii* with unusual characteristics. *J Bacteriol* **195**:2197 – 2206.
- He R, Ma L, Li C, Jia W, Li D, Zhang D, Chen S (2014) Trpac1, a pH response transcription regulator, is involved in cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb Technol* **67**:17 – 26.
- Heerikhuisen M, Van den Hondel C, Punt P (2005) *Aspergillus sojae*, pp 191-214. In: Gellissen G (ed) *Production of recombinant proteins. Novel microbial and eukaryotic expression systems*. WILEY-VCH, Weinheim.
- Hilz H (2007) Characterization of cell wall polysaccharides in bilberries and black currants. Tesis doctoral, Wageningen University.
- Hongo S, Sato K, Yokoyama R, Nishitani K (2012) Demethylesterification of the primary wall by PECTIN METHYLESTERASE35 provides mechanical support to the Arabidopsis stem. *Plant Cell* **24**:2624 – 2634.
- Houbraken J, de Vries RP, Samson RA (2014) Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Adv Appl Microbiol* **86**:e249.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Shevchik VE (2014) Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environ Microbiol Rep* **6**:427–440.
- Huisman MM, Brüll LP, Thomas-Oates JE, Haverkamp J, Schols HA, Voragen AG (2001) The occurrence of internal (1→5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. *Carbohydr Res* **330**:103 – 114.
- Idnurm A, Howlett BJ (2001) Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol Plant Pathol* **2**:241–255.
- Immerzeel P, Eppink MM, De Vries SC, Schols HA, Voragen AG (2006) Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins. *Physiol Plant* **128**:18 –28.

- Ishii T, Matsunaga T (2001) Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry* **57**:969 – 974.
- Ishii T, Matsunaga T, Pellerin P, O'Neill MA, Darvill A, Albersheim P (1999) The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *J Biol Chem* **274**:13098 – 13104.
- Itoh T, Ochiai A, Mikami B, Hashimoto W, Murata K (2006) A novel glycoside hydrolase family 105: the structure of family 105 unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase complexed with a disaccharide in comparison with family 88 enzyme complexed with the disaccharide. *J Mol Biol* **360**:573 – 85.
- Iwai M, Yamada H, Ikemoto T, Matsumoto S, Fujiwara D, Takenaka S, Sakamoto T (2015a) Biochemical characterization and overexpression of an endo-rhamnogalacturonan lyase from *Penicillium chrysogenum*. *Mol Biotechnol* **57**:539 – 548.
- Iwai M, Kawakami T, Ikemoto T, Fujiwara D, Takenaka S, Nakazawa M, Ueda M, Sakamoto T (2015b) Molecular characterization of a *Penicillium chrysogenum* exo-rhamnogalacturonan lyase that is structurally distinct from other polysaccharide lyase family proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**:8515 – 8525.
- Jayani RS, Saxena S, Gupta R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem* **40**:2931 – 2944.
- Jensen JK, Sørensen SO, Harholt J, Geshi N, Sakuragi Y, Møller I, Zandleven J, Bernal AJ, Jensen NB, Sørensen C, Pauly M, Beldman G, Willats WGT, Scheller HV (2008) Identification of a xylogalacturonan xylosyltransferase involved in pectin biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**:1289 – 1302.
- Jørgensen TR (2007) Identification and toxigenic potential of the industrially important fungi, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. *J Food Prot* **70**:2916 – 2934.
- Kaji A, Shimokawa K (1984) New exo-type arabinase from *Erwinia carotovora* IAM1024. *Agric Biol Chem* **48**:67 – 72.
- Kars I, Krooshof GH, Wagemakers L, Joosten R, Benen JAE, van Kan JAL (2005) Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *The Plant J* **43**:213 – 225.
- Kauppinen S, Christgau S, Kofod LV, Halkier T, Dörreich K, Dalbøge H (1995) Molecular cloning and characterization of a rhamnogalacturonan acetylcetase from *Aspergillus aculeatus*. Synergism between rhamnogalacturonan degrading enzymes. *J Biol Chem* **270**:27172 – 27178.
- Kikot GE, Hours RA, Alconada TM (2010) Extracellular enzymes of *Fusarium graminearum* isolates. *Braz Arch Biol Technol* **53**:779 – 783.
- Kluskens LD, Van Alebeek GJW, Voragen AG (2003) Molecular and biochemical characterization of the thermoactive family 1 pectate lyase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biochem J* **370**:651 – 659.
- Kohli P, Gupta R (2015) Alkaline pectinases: a review. *Biocatal Agric Biotechnol* **4**:279–285.

- Komalavilas P, Mort AJ (1989) The acetylation of O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. *Carbohydr Res* **189**:261 – 272.
- Kotake T, Hirata N, Degi Y, Ishiguro M, Kitazawa K, Takata R, Ichinose H, Kaneko S, Igarashi K, Samejima M, Tsumuraya Y (2011) Endo- β -1, 3-galactanase from winter mushroom *Flammulina velutipes*. *J Biol Chem* **286**:27848 – 27854.
- Kowalczyk JE, Lubbers RJM, Peng M, Battaglia E, Visser J, de Vries RP (2017) Combinatorial control of gene expression in *Aspergillus niger* grown on sugar beet pectin. *Sci Rep* **7**:12356.
- Kunitake E, Hagiwara D, Miyamoto K, Kanamaru K, Kimura M, Kobayashi T (2016) Regulation of genes encoding cellulolytic enzymes by Pal-PacC signaling in *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**:3621 – 3635.
- Kurtzman CP, Smiley MJ, Robnett CJ, Wicklow DT (1986) DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia* **78**:955 – 959.
- Laatu M, Condemine G (2003) Rhamnogalacturonate lyase RhiE is secreted by the out system in *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol* **185**:1642 – 1649.
- Lahaye M, Vigouroux J, Thibault JF (1991) Endo- β -1,4-D-galactanase from *Aspergillus niger* var. *aculeatus*: purification and some properties. *Carbohydr Polym* **15**:431 – 444.
- Lau JM, McNeil M, Darvill AG, Albersheim P (1987) Treatment of rhamnogalacturonan I with lithium in ethylenediamine. *Carbohydr Res* **168**:245 – 274.
- Laurent MA, Boulenguer P (2003) Stabilization mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin. *Food Hydrocolloids* **17**:445 – 454.
- Le Goff A, Renard CMGC, Bonnin E, Thibault JF (2001) Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydr Polym* **45**:325 – 334.
- Lebreton-Decoster C, Rousselle P, Laperdrix C, Lubrano C, Robin JR, Coulomb B (2011) Oligogalacturonides improve tissue organization of in vitro reconstructed skin. *Int J Cosmet Sci* **33**:455 – 461.
- Lei SP, Lin HC, Wang SS, Callaway J, Wilcox G (1987) Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase. *J Bacteriol* **169**:4379 – 4383.
- Lerouge P, O'Neill MA, Darvill AG, Albersheim P (1993) Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydr Res* **243**:359 – 371.
- Li Z, Bai Z, Zhang B, Li B, Jin B, Zhang M, Lin F, Zhang H (2012) Purification and characterization of alkaline pectin lyase from a newly isolated *Bacillus clausii* and its application in elicitation of plant disease resistance. *Appl Biochem Biotechnol* **167**:2241 – 2256.
- Liu Z, Bhattacharyya S, Ning B, Midoro-Horiuti T, Czerwinski EW, Goldblum RM, Mort A, Kearney CM (2010) Plant-expressed recombinant mountain cedar allergen Jun a

- 1 is allergenic and has limited pectate lyase activity. *Int Arch Allergy Immunol* **153**:347 – 358.
- Macquet A, Ralet MC, Loudet O, Kronenberger J, Mouille G, Marion-Poll A, North HM (2007) A naturally occurring mutation in an *Arabidopsis* accession affects a β -D-galactosidase that increases the hydrophilic potential of rhamnogalacturonan I in seed mucilage. *Plant Cell* **19**:3990 – 4006.
- Marín-Rodríguez MC, Orchard J, Seymour GB (2002) Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J Exp Bot* **53**:2115 – 2119.
- Marín-Rodríguez MC, Smith DL, Manning K, Orchard J, Seymour GB (2003) Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. *Plant Mol Biol* **51**:851 – 857.
- Mata-Gómez MA, Heerd D, Oyanguren-García I, Barbero F, Rito-Palomares M, Fernández-Lahore M (2015) A novel pectin-degrading enzyme complex from *Aspergillus sojae* ATCC 20235 mutants. *J Sci Food Agric* **95**:1554 – 1561.
- Matsumoto S, Yamada H, Kunishige Y, Takenaka S, Nakazawa M, Ueda M, Sakamoto T (2017) Identification of a novel *Penicillium chrysogenum* rhamnogalacturonan rhamnohydrolase and the first report of a rhamnogalacturonan rhamnohydrolase gene. *Enzyme Microb Technol* **98**:76 – 85.
- McKie VA, Gary W, Millward-Sadler SJ, Hazlewood GP, Laurie JI, Gilbert HJ (1997) Arabinanase A from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* exhibits both an endo- and an exo-mode of action. *Biochem J* **323**:547 – 555.
- McKie VA, Vincken JP, Voragen AGJ, van den Broek LAM, Stimson E, Gilbert HJ (2001) A new family of rhamnogalacturonan lyases contains an enzyme that binds to cellulose. *Biochem J* **355**:167 – 177.
- McNeil M, Darvill AG, Albersheim P (1979) The structural polymers of the primary cell walls of dicots, pp 191-249. In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer Vienna.
- McNeil M, Darvill AG, Albersheim P (1980) Structure of plant cell walls. *Plant Physiol* **66**:1128 – 1134.
- Mello-de-Sousa TM, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ (2011) Carbon source and pH-dependent transcriptional regulation of cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. *Enzyme Microb Technol* **48**:19 – 26.
- Mertens JA, Bowman MJ (2016) Kinetic properties of *Rhizopus oryzae* RPG1 endopolygalacturonase hydrolyzing galacturonic acid oligomers. *Biocatal Agric Biotechnol* **5**:11 – 16.
- Micheli F (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci* **6**:414–419.
- Mogoşanu GD, Grumezescu AM (2014) Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int J Pharm* **463**:127 – 136.

- Mohnen D (1999) pp 497–527. In: Barton D, Nakanishi K, Meth-Cohn O (eds) Comprehensive natural products chemistry. Elsevier, Dordrecht, The Netherlands.
- Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* **11**:266 – 277.
- Mohnen D, Doong RL, Liljebjelke K, Fralish G, Chan J (2003) pp 109–127. In: Visser J, Voragen AGJ (eds) Pectins and pectinases. Elsevier Science BV, Amsterdam.
- Mojsov K (2012) Biotechnological applications of pectinases in textile processing and bioscouring of cotton fibers, pp 314-322. In: II International Conference Industrial Engineering and Environmental Protection 2012 (IIZS 2012), proceedings. Zrenjanin, Serbia.
- Morris ER, Powell DA, Gidley MJ, Rees DA (1982) Conformations and interactions of pectins: I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *J Mol Biol* **155**:507 – 516.
- Murakami H (1971) Classification of the koji mold. *J Gen Appl Microbiol* **17**:281 – 309.
- Mutenda KE, Körner R, Christensen TM, Mikkelsen J, Roepstorff P (2002) Application of mass spectrometry to determine the activity and specificity of pectin lyase A. *Carbohydr Res* **337**:1217 –1227.
- Mutter M, Beldman G, Pitson SM, Schols HA, Voragen AG (1998) Rhamnogalacturonan α -d-Galactopyranosyluronohydrolase An Enzyme That Specifically Removes the Terminal Nonreducing Galacturonosyl Residue in Rhamnogalacturonan Regions of Pectin. *Plant Physiol* **117**:153 – 163.
- Mutter M, Beldman G, Schols HA, Voragen AGJ (1994) Rhamnogalacturonan [alpha]-L-Rhamnopyranohydrolase (A Novel Enzyme Specific for the Terminal Nonreducing Rhamnosyl Unit in Rhamnogalacturonan Regions of Pectin). *Plant Physiol* **106**:241 – 250.
- Mutter M, Colquhoun IJ, Schols HA, Beldman G, Voragen AG (1996) Rhamnogalacturonase B from *Aspergillus aculeatus* Is a Rhamnogalacturonan [alpha]-L-Rhamnopyranosyl-(1-> 4)-[alpha]-D-Galactopyranosyluronide Lyase. *Plant Physiol* **110**:73 – 77.
- Nakamura A, Furuta H, Maeda H, Takao T, Nagamatsu Y (2002) Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**:1301 – 1313.
- Nakamura T, Hours RA, Sakai T (1995) Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *J Food Sci* **60**:468 – 472.
- Nakano H, Takenishi S, Kitahata S, Kinugasa H, Watanabe Y (1990) Purification and characterization of an exo-1, 4- β -galactanase from a strain of *Bacillus subtilis*. *FEBS J* **193**:61 – 67.
- Ndeh D, Rogowski A, Cartmell A, Luis AS, Baslé A, Gray J, ... , Gilbert HJ (2017) Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature* **544**:65 –70.

- Negrete-Urtasun S, Reiter W, Diez E, Denison SH, Tilburn J, Espeso EA, Peñalva MA, Arst Jr HN (1999) Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol Microbiol* **33**:994 – 1003.
- Niu J, Alazi E, Reid ID, Arentshorst M, Punt PJ, Visser J, Tsang A, Ram AF (2017) An evolutionarily conserved transcriptional activator-repressor module controls expression of genes for d-galacturonic acid utilization in *Aspergillus niger*. *Genet* **205**:169 – 183.
- Niu J, Homan TG, Arentshorst M, de Vries RP, Visser J, Ram AF (2015) The interaction of induction and repression mechanisms in the regulation of galacturonic acid-induced genes in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet Biol* **82**:32 – 42.
- Ochiai A, Itoh T, Kawamata A, Hashimoto W, Murata K (2007) Plant cell wall degradation by saprophytic *Bacillus subtilis* strains: gene clusters responsible for rhamnogalacturonan depolymerization. *Appl Environ Microbiol* **73**:3803 – 3813.
- Ochoa-Villarreal M Aispuro-Hernández E, Vargas-Arispuro I, Martínez-Téllez MA (2012) Plant cell wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives. In: De Sousa Gómez A (ed) Polymerization. InTech.
- Ogawa M, Kay P, Wilson S, Swain SM (2009) ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**:216 – 233.
- Okemoto K, Uekita T, Tsumuraya Y, Hashimoto Y, Kasama T (2003) Purification and characterization of an endo- β -(1 \rightarrow 6)-galactanase from *Trichoderma viride*. *Carbohydr Res* **338**:219 – 230.
- O'Neill M, Albersheim P, Darvill A (1990) pp 415–441. In: Dey PM (ed) Methods in plant biochemistry. Academic Press, London.
- O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG (2004) Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu Rev Plant Biol* **55**:109 – 139.
- O'Neill MA, York WS (2003) pp 1–54. The composition and structure of plant primary cell walls. In: Rose JCK (ed) The Plant Cell Wall. Blackwell Publishing/CRC Press. Ithaca, New York.
- Oosterveldt A, Grabber JH, Beldman G, Ralph J, Voragen AG (1997) Formation of ferulic acid dehydrodimers through oxidative cross-linking of sugar beet pectin. *Carbohydr Res* **300**:179 – 189.
- Paniagua C, Kirby AR, Gunning AP, Morris VJ, Matas AJ, Quesada MA, Mercado JA (2017) Unravelling the nanostructure of strawberry fruit pectins by endo-polygalacturonase digestion and atomic force microscopy. *Food Chem* **224**:270 – 279.
- Parenicová L, Benen JAE, Kester HCM, Visser J (1998) pgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. *Eur J Biochem* **251**:72 – 80.

- Pařenicová L, Benen JA, Kester HC, Visser J (2000) pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *Biochem J* **345**:637 – 644.
- Pellerin P, Brillouet JM (1994) Purification and properties of an exo-(1→3)-β-D-galactanase from *Aspergillus niger*. *Carbohydr Res* **264**:281 – 291.
- Pilnik W, Rombouts FM (1981) Pectic enzymes, pp 105-28. In: Birch GG, Blakebrough N, Parker KJ (eds) *Enzymes and Food Processing*. Springer, Dordrecht.
- Pitson SM, Mutter M, van den Broek LA, Voragen AG, Beldman G (1998) Stereochemical Course of Hydrolysis Catalysed by α-L-Rhamnosyl and α-D-Galacturonosyl Hydrolases from *Aspergillus aculeatus*. *Biochem Biophys Res Commun* **242**:552 – 559.
- Popeijus H, Overmars H, Jones J, Blok V, Goverse A, Helder J, Schots A, Bakker J, ..., Smant G (2000) Enzymology: degradation of plant cell walls by nematode. *Nature* **406**:36 – 37.
- Quintanilla D, Hagemann T, Hansen K, Gernaey KV (2015) Fungal Morphology in Industrial Enzyme Production—Modelling and Monitoring. In: Krull R, Bley T (eds) *Filaments in Bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 149. Springer, Cham.
- Ralet MC, André-Leroux G, Quémener B, Thibault JF (2005) Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall. *Phytochemistry* **66**:2800 – 2814.
- Ralet MC, Bonnin E, Thibault JF (2001) Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl* **753**:157 – 166.
- Ralet MC, Thibault JF, Faulds CB, Williamson G (1994) Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell walls of sugar-beet pulp. *Carbohydr Res* **263**:227 – 241.
- Reid I, Ricard M (2000) Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. *Enzyme Microb Technol* **26**:115 – 123.
- Remoroza C, Wagenknecht M, Gu F, Buchholt HC, Moerschbacher BM, Schols HA, Gruppen H (2014) A *Bacillus licheniformis* pectin acetyltransferase is specific for homogalacturonans acetylated at O-3. *Carbohydr Polym* **107**:85 – 93.
- Renard CM, Crépeau MJ, Thibault JF (1995) Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins. *Carbohydr Res* **275**:155 – 165.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A (eds) (2006) *Handbook of enology, the microbiology of wine and vinifications* (vol 1). John Wiley & Sons.
- Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**:929 – 967.

- Rihouey C, Morvan C, Borissova I, Jauneau A, Demarty M, Jarvis M (1995) Structural features of CDTA-soluble pectins from flax hypocotyls. *Carbohydr Polym* **28**:159 – 166.
- Roach MJ, Mokshina NY, Badhan A, Snegireva AV, Hobson N, Deyholos MK, Gorshkova TA (2011) Development of cellulosic secondary walls in flax fibers requires β -galactosidase. *Plant Physiol* **156**:1351 – 1363.
- Rollins JA (2003) The *Sclerotinia sclerotiorum* pac1 gene is required for sclerotial development and virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **16**:785 – 795.
- Rombouts FM, Pilnik W (1980) Pectic enzymes. In: Rose AH (ed) Microbial enzymes and Bioconversions. Academic Press, London.
- Rossi A, Cruz AH, Santos RS, Silva PM, Silva EM, Mendes NS, Martinez-Rossi NM (2013) Ambient pH sensing in filamentous fungi: pitfalls in elucidating regulatory hierarchical signaling networks. *Iubmb Life* **65**:930 – 935.
- Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme EJ (1993) Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv Appl Microbiol* **39**:213 – 294.
- Sakamoto T, Ishimaru M (2013) Peculiarities and applications of galactanolytic enzymes that act on type I and II arabinogalactans. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:5201 – 5213.
- Sakamoto T, Nishimura Y, Makino Y, Sunagawa Y, Harada N (2013) Biochemical characterization of a GH53 endo- β -1, 4-galactanase and a GH35 exo- β -1, 4-galactanase from *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:2895 – 2906.
- Sakamoto T, Thibault JF (2001) Exo-arabinanase of *Penicillium chrysogenum* able to release arabinobiose from α -1, 5-L-arabinan. *Appl Environ Microbiol* **67**:3319 – 3321.
- Savatin DV, Ferrari S, Sicilia F, De Lorenzo G (2011) Oligogalacturonide-auxin antagonism does not require post transcriptional gene silencing or stabilization of auxin response repressors in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **157**:1163 – 1174.
- Schols HA, Bakx EJ, Schipper D, Voragen AGJ (1995) A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydr Res* **279**:265 – 279.
- Schols HA, Geraeds CC, Searle-van Leeuwen MF, Kormelink FJ, Voragen AG (1990) Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins. *Carbohydr Res* **206**:105–115.
- Schols HA, Posthumus MA, Voragen AG (1990) Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process. *Carbohydr Res* **206**:117–129.
- Schols HA, Voragen AG (1994) Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydr Res* **256**:83 – 95.

- Schols HA, Voragen AGJ (1996) pp 3–21. In: Visser J, Voragen AGJ (eds) Pectins and pectinases. Elsevier Science BV, Amsterdam.
- Searle-van Leeuwen MJF, Van den Broek LAM, Schols HA, Beldman G, Voragen AGJ (1992) Rhamnogalacturonan acetyltransferase: a novel enzyme from *Aspergillus aculeatus*, specific for the deacetylation of hairy (ramified) regions of pectins. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**:347 – 349.
- Searle-van Leeuwen MJF, Vincken JP, Schipper D, Voragen AGJ, Beldman G (1996) Acetyl esterases of *Aspergillus niger*: purification and mode of action on pectins. *Prog Biotechnol* **14**:793 – 798.
- Shevchik VE, Condemine G, Robert-Baudouy J, Hugouvieux-Cotte-Pattat N (1999a) The exopolygalacturonate lyase PelW and the oligogalacturonate lyase Ogl, two cytoplasmic enzymes of pectin catabolism in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* **181**:3912 – 3919.
- Shevchik VE, Hugouvieux-Cotte-Pattat N (1997) Identification of a bacterial pectin acetyl transferase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Microbiol* **24**:1285 – 1301.
- Shevchik VE, Hugouvieux-Cotte-Pattat N (2003) PaeX, a second pectin acetyltransferase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* **185**:3091 – 3100.
- Shevchik VE, Kester HC, Benen JA, Visser J, Robert-Baudouy J, Hugouvieux-Cotte-Pattat N (1999b) Characterization of the exopolygalacturonate lyase PelX of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol* **181**:1652 – 1663.
- Shi DC, Wang J, Hu RB, Zhou GK, O'Neill MA, Kong YZ (2017) Boron-bridged RG-II and calcium are required to maintain the pectin network of the *Arabidopsis* seed mucilage ultrastructure. *Plant Mol Biol* **94**:267 – 280.
- Siedlecka A, Wiklund S, Péronne MA, Micheli F, Lesniewska J, Sethson I, Edlund U, Richard L, Sundberg B, Mellerowicz EJ (2008) Pectin methyl transferase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood cells of *Populus*. *Plant Physiol* **146**:554 – 565.
- Silva IR, Jers C, Meyer AS, Mikkelsen JD (2016) Rhamnogalacturonan I modifying enzymes: an update. *New Biotechnol* **33**:41 – 54.
- Singh B, Avci U, Eichler Inwood SE, Grimson MJ, Landgraf J, Mohnen D, Sørensen I, Wilkerson CG, Willats WGT, Haigler CH (2009) A specialized outer layer of the primary cell wall joins elongating cotton fibers into tissue-like bundles. *Plant Physiol* **150**:684 – 699.
- Spellman MW, McNeil M, Darvill AG, Albersheim P (1983) Characterization of a structural complex heptasaccharide isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Carbohydr Res* **122**:115–129.
- Sriamornsak P (2011) Application of pectin in oral drug delivery. *Expert Opin Drug Delivery* **8**:1009 – 1023.
- Stevenson TT, Darvill AG, Albersheim P (1988) Structural features of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Carbohydr Res* **179**:269 – 288.

- Taniguchi Y, Ono A, Sawatani M, Nanba M, Kohno K, Usui M, Kurimoto M, Matuhasi T (1995) Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. *Allergy* **50**:90 – 93.
- Tavares EQ, De Souza AP, Buckeridge MS (2015) How endogenous plant cell-wall degradation mechanisms can help achieve higher efficiency in saccharification of biomass. *J Exp Bot* **66**:4133 – 4143.
- Thibault JF, Renard CMGC, Axelos MAV, Roger P, Crepeau MJ (1993) *Carbohydr Res* **238**:271– 286.
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Peñalva MA, Arst Jr HN (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid-and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* **14**:779 – 790.
- Tsumuraya Y, Mochizuki N, Hashimoto Y, Kovac P (1990) Purification of an exo-beta-(1→3)-D-galactanase of *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) and its action on arabinogalactan-proteins. *J Biol Chem* **265**:7207 –7215.
- Ugliano M (2009) Enzymes in winemaking, pp 103-126. In: Moreno-Arribas MV, Polo MC (eds) Wine chemistry and biochemistry. Springer, New York, USA.
- Ushijima S, Hayashi K, Murakami H (1982) The current taxonomic status of *Aspergillus sojae* used in *Shoyu* fermentation. *Agric Biol Chem* **46**:2365 –2367.
- Ustok FI, Tari C, Gogus N (2007) Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *J Biotechnol* **127**:322 – 334.
- van de Vis JW (1994) Characterization and mode of action of enzymes degrading galactan structures of arabinogalactans. Tesis Doctoral, Wageningen University.
- van der Vlugt-Bergmans CJB, Meeuwssen PJA, Voragen AGJ, van Ooyen AJJ (2000) Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme. *Appl Environ Microbiol* **66**:36 – 41.
- van Munster JM, Daly P, Delmas S, Pullan ST, Blythe MJ, Malla S, ..., Archer DB (2014) The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet Biol* **72**:34 – 47.
- Vauquelin M (1790) Analyse du tamarin. *Annales de Chimie* **5**:92 – 106.
- Vincken JP, Schols HA, Oomen RJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AG, Visser RG (2003) If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol* **132**:1781 – 1789.
- Vita CE (2013) Enzimas pécticas de *Aspergillus kawachii*: aislamiento, purificación y caracterización de pectinesterasa. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Wicker L, Kim Y, Kim MJ, Thirkield B, Lin Z, Jung J (2014) Pectin as a bioactive polysaccharide – Extracting tailored function from less. *Food Hydrocolloids* **42**:251 – 259.

- Williamson G (1991) Purification and characterization of pectin acetylerase from orange peel. *Phytochemistry* **30**:445 – 449.
- Yadav S, Yadav PK, Yadav D, Yadav KDS (2009) Pectin lyase: a review. *Process Biochem* **4**:1–10.
- Yapo BM (2011) Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydr Polym* **86**:373 – 385.
- York WS, Darvill AG, McNeil M, Albersheim P (1985) 3-Deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectin polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydr Res* **138**:109 – 126.
- Yoshimi Y, Yaguchi K, Kaneko S, Tsumuraya Y, Kotake T (2017) Properties of two fungal endo- β -1, 3-galactanases and their synergistic action with an exo- β -1, 3-galactanase in degrading arabinogalactan-proteins. *Carbohydr Res* **453-454**:20 – 35.
- Young RE, McFarlane HE, Hahn MG, Western TL, Haughn GW, Samuels AL (2008) Analysis of the Golgi apparatus in *Arabidopsis* seed coat cells during polarized secretion of pectin-rich mucilage. *Plant Cell* **20**:1623 – 1638.
- Zandleven J, Beldman G, Bosveld M, Benen J, Voragen A (2005) Mode of action of xylogalacturonan hydrolase towards xylogalacturonan and xylogalacturonan oligosaccharides. *Biochem J* **387**:719 –725.
- Zandleven J, Beldman G, Bosveld M, Schols HA, Voragen AGJ (2006) Enzymatic degradation studies of xylogalacturonans from apple and potato, using xylogalacturonan hydrolase. *Carbohydr Polym* **65**:495 – 503.
- Zandleven J, Sørensen SO, Harholt J, Beldman G, Schols HA, Scheller HV, Voragen AJ (2007) Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **68**:1219 – 1226.

Capítulo 2

Optimización de la producción de poligalacturonasa por *Aspergillus sojae* en cultivos sumergidos empleando residuos agroindustriales

Resumen

El presente capítulo se centra en el estudio de la producción de PGasa por *A. sojae* en cultivos sumergidos aprovechando residuos agroindustriales, poniendo especial atención en el uso de cáscaras de soja. Luego de un estudio preliminar de producción con varios subproductos, se eligió emplear cáscaras de soja y se continuó con la búsqueda de componentes relevantes del medio de cultivo y optimización de los mismos para maximizar la actividad PGasa, empleando fundamentalmente diseño experimental multivariado y metodología de superficie de respuesta. De esta forma se mejoró la productividad volumétrica al doble mediante una variación en el pH inicial del cultivo en un rango muy pequeño de pH ácido que oscila en 2.60. El proceso optimizado se transfirió exitosamente a biorreactores de tanque agitado en términos de productividad volumétrica. A su vez, se obtuvo una actividad PGasa de 42 U/ml con un rendimiento de 1.39 U/g de cáscara de soja, un valor que se sitúa dentro de los más elevados reportados con este subproducto. El incremento de la concentración del medio de cultivo al doble en biorreactor no se tradujo en una duplicación de la productividad volumétrica, y la evolución del oxígeno disuelto a lo largo del proceso es coherente con una limitación del cultivo en oxígeno. En este medio de cultivo el microorganismo produjo también actividad xilanasa. La caracterización morfológica del cultivo reveló que *A. sojae* se desarrolló como micelio disperso a valores de pH inicial de 2.40 -2.80 mientras que, a la inversa, a pH 5.40 predominó la morfología de pellets.

Por otro lado, se estudió la producción de actividad PGasa con cáscaras de naranja, pomazas de durazno y damasco, empleando una cepa de *A. sojae* superproductora. Se utilizaron diseños de superficie de respuesta de Doehlert para estudiar la producción de PGasa con estos tres residuos por separado, y finalmente el cultivo se transfirió a biorreactores de tanque agitado en los que se ensayaron diferentes perfiles de agitación y aireación con un medio de cultivo compuesto por una mezcla de cáscaras de naranja y pomaza de damasco. Controlando el oxígeno disuelto con el flujo de aire a un valor fijo de agitación (600 rpm), la tensión de oxígeno disuelto se mantuvo sobre el 25 % a lo largo del cultivo y se obtuvieron los mejores resultados, una producción de 380 U/ml, que representa una mejora en 1.5 veces respecto a los niveles obtenidos llevando a cabo la fermentación a flujo de aire y velocidad de agitación constantes (1 vvm y 600 rpm).

Introducción

La producción de enzimas industriales con destino comercial, como es el caso de las pectinasas, se lleva a cabo principalmente con hongos filamentosos [Quintanilla et al., 2015]. Un aspecto del proceso de producción que requiere especial consideración es el desarrollo del medio de cultivo, ya que una elección adecuada de los componentes empleados para el cultivo del microorganismo puede acelerar ciertos procesos metabólicos y consecuentemente contribuir a reducir el tiempo de cultivo e incrementar la producción enzimática [Galiotou-Panayotou et al., 1997]. La potencial aplicación comercial de las enzimas depende de una producción en altos niveles, a costos bajos o moderados. Por lo tanto, detectar y optimizar los componentes que afectan esta producción son la principal tarea para poder implementar un proceso biológico.

A la hora de optimizar un bioproceso pueden distinguirse dos estrategias: el enfoque univariado y el multivariado. En el primero, un único factor es variado en el tiempo (OVAT, *one variable at a time*) mientras que los demás factores se mantienen constantes. Las desventajas de este procedimiento clásico de optimización radican en que no tiene en cuenta que pueden existir efectos de interacción entre factores; además, a medida que el número de factores se incrementa, resulta necesario realizar un número importante de experimentos, y generalmente el dominio experimental explorado es más pequeño comparado con el examinado mediante el enfoque multivariado [Candioti et al., 2014]. Por otro lado, con la estrategia multivariada pueden estudiarse varios factores en simultáneo con un número predefinido de experimentos, variando los niveles de todos los factores involucrados en el proceso. Por lo tanto, el diseño de experimentos multivariado resulta de utilidad ya que ahorra tiempo, esfuerzo, recursos y facilita la obtención de grandes cantidades de datos con un número mínimo de experimentos [Brereton, 2003]. El diseño de experimentos y la metodología de superficie de respuesta son herramientas empleadas frecuentemente en bioprocesos [Mandenius & Brundin, 2008]. Esta última consiste en la generación de una superficie en respuesta a los resultados de un diseño experimental, la cual provee información que generalmente se modela a través del ajuste por cuadrados mínimos o, excepcionalmente, a través de redes neuronales [Candioti et al., 2014].

En cultivos sumergidos con hongos filamentosos en biorreactores de tanque agitado pueden ocurrir dos problemas principales, ambos relacionados con la

agitación del medio, que son el esfuerzo de corte que experimenta el micelio y la energía requerida para mantener el sistema homogéneo y favorecer la transferencia de oxígeno [Fontana et al., 2012]. Adicionalmente, el incremento de biomasa durante el cultivo de estos microorganismos puede llevar a incrementos no deseados de viscosidad, limitando potencialmente el suministro de nutrientes por un mezclado insuficiente [Krull et al., 2013]. La utilización de residuos agroindustriales como afrecho de trigo o cáscaras de naranja puede contribuir a incrementar aún más la viscosidad del caldo de cultivo [Moreira et al., 2005; Buyukkileci et al., 2015].

Otro aspecto importante a tener en cuenta son las características morfológicas del hongo filamentoso, ya que el mismo puede desarrollar desde una conformación miceliar dispersa hasta agregados claramente definidos de biomasa en forma de pellet. La morfología óptima de cada bioproceso depende en gran parte del producto deseado, por lo que resulta difícil generalizar al respecto [Gibbs et al., 2000]. Se ha encontrado que la morfología predominante depende de varios factores tales como la concentración del inóculo, pH del medio, temperatura o concentración de oxígeno disuelto [Deckwer et al., 2006].

Varios residuos agroindustriales tales como afrecho de trigo, subproductos del procesamiento de cítricos, pomaza de manzana u orujos de uva, entre otros, se han empleado para el estudio de la producción de pectinasas [Blandino et al., 2002; Giese et al., 2008; Ruiz et al., 2012; Botella et al., 2007; Hours et al., 1988]. La cáscara de soja es un subproducto resultante del procesamiento del poroto para la obtención de aceite y productos proteicos para uso alimentario [Al Loman & Ju, 2016]. De acuerdo con datos recabados del Departamento de Agricultura de Estados Unidos la producción mundial de soja se incrementó un 41 % en los últimos 10 años, llegando a 313 millones de toneladas en la temporada 2015/2016. Casi el 90 % de la producción proviene del continente americano, específicamente de Brasil, Estados Unidos y Argentina, generando este último un 18 % del total. La cubierta del poroto o cáscara de soja, que representa un 8 % del haba [Mielenz et al., 2009], carece de gran valor comercial y se destina fundamentalmente a alimentación de rumiantes. A diferencia de otros subproductos de plantas, la cáscara de soja contiene cantidades apreciables de pectina (6-15 %) y se encuentra muy poco lignificada (3%), lo que contribuye a plantear como interrogante si este material puede ser empleado como sustrato para la producción de pectinasas. Por otro lado, la pomaza de damasco es un subproducto primario de la industria procesadora de damascos y representa un

10 % del total del fruto procesado para la obtención de jugo y puré [Sanal et al., 2004]. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO), Turquía un país líder en la producción de damascos con un total de 0.79 toneladas, equivalente a un 20 % de la producción mundial en 2012. De la pomaza de durazno, otro residuo de características similares a la pomaza de damasco, se generan aproximadamente las mismas cantidades en Turquía que en el caso anterior. La pomaza de duraznos almacenada en frío es particularmente rica en contenido de pectina, pudiendo representar un 18 % del peso total del residuo [Pagán et al., 2001], lo cual es comparable a otros residuos con un elevado contenido de pectina como la cáscara de naranja [Yapo et al., 2007].

Materiales y métodos

Reactivos

El ácido poligalacturónico (APG) (sal sódica, AGA = 90 %), AGA y xilano de madera de abedul (xilosa ≥ 90 %) se adquirieron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, EUA). Los demás químicos y reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Durante los ensayos de producción enzimática se utilizó como fuente de carbono y energía los siguientes subproductos industriales derivados del procesamiento de frutas y leguminosas: cáscaras de soja, cáscaras de naranja, cáscaras de limón, cáscaras de lima, orujo de uvas, pomaza de peras, pomaza de duraznos y pomaza de damascos. Las cáscaras de soja y naranja fueron cedidas gentilmente por compañías locales productoras de aceite (Biomadero SA) y por la Federación Citrícola de Entre Ríos (FECIER), respectivamente. Las cáscaras de limón provienen de la empresa Citrinor (Tucumán, Argentina), mientras que las cáscaras de lima fueron provistas por una compañía citrícola peruana. Para el caso de las pomazas de durazno y damasco, estas se obtuvieron de una empresa procesadora de frutas de Turquía. El orujo de uva fue provisto por la Cooperativa de la Costa (Berisso). Finalmente, la pomaza de pera se obtuvo mediante el prensado de peras adquiridas a un mercado local de La Plata, utilizando una prensa de laboratorio (Hafico, HP 2H9).

En todos los casos el material se secó a 60° C en estufa durante 2 días y se molió con un molinillo de laboratorio (Cyclotec 1093 SampleMill, Tecator, Suecia). De esta forma los subproductos se redujeron a polvillos finos, los cuales al ser

tamizados pasaban por mallas de tamaño de poro N° 35 mientras que eran retenidas por tamices de malla 150 ($500\text{ }\mu\text{m} > \varnothing > 105\text{ }\mu\text{m}$).

Microorganismo y conservación de cepas

La mayoría de los estudios de este capítulo, así como todos los demás estudios presentados en esta tesis, se realizaron con la cepa de *Aspergillus sojae* ATCC 20235, perteneciente al American Type of Culture Collection, la cual fue proporcionada por la Dra. Canan Tari del Izmir Institute of Technology (IZTECH) en Urla, Izmir, Turquía. Adicionalmente, se utilizó una cepa descendiente de *A. sojae* ATCC 20235, obtenida siguiendo una estrategia de mutagénesis al azar y selección empleando luz ultravioleta [Heerd et al., 2014]; la cepa mutante fue proporcionada gentilmente por el Dr. Marcelo Fernández Lahore de la Jacobs University en Bremen, Alemania. A menos que se indique lo contrario, los estudios presentados en esta tesis se realizaron con la cepa ATCC 20235. Los microorganismos, recibidos como cultivos en crio-tubos con medio agarizado, se propagaron en tubos con medio YME en pico de flauta (10 g/L de extracto de malta, 4 g/L de extracto de levadura, 4 g/L de glucosa, 20 g/L de agar) y se incubaron en estufa a 30° C hasta esporulación. Uno de los tubos por cada cepa se conservó refrigerado a 4° C por un período no mayor a 3 meses, para ser utilizado como cultivo madre.

Los conidios producidos de los cultivos con medio YME se resuspendieron mediante el agregado de una solución crioprotectora de glicerol (20 % p/v) y posterior raspado de la superficie del cultivo en forma homogénea con un ansa en anillo esterilizada a la llama. Las suspensiones resultantes se dispensaron en crio-tubos a razón de 1 ml por tubo, y se preservaron a -80° C.

Preparación del inóculo

Los cultivos fueron inoculados con conidios. Para la obtención de los mismos se realizó un repique del cultivo madre a tubos con medio agar-melaza en pico de flauta, con la siguiente composición: glicerol (45 g/L), peptona (18 g/L), melaza de caña (45 g/L), NaCl (5 g/L), KCl (0.5 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (15 mg/L), KH_2PO_4 (60 mg/L), MgSO_4 (50 mg/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (12 mg/L), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (15 mg/L), agar (20 g/L) [Gögüs et al., 2006]. Después de una semana de incubación a 30° C, los conidios fueron cosechados cubriendo la superficie crecida con una solución

acuosa de Tween-80 al 0.02 % v/v y procediendo como se explica más arriba. La concentración de conidios se determinó mediante recuento directo al microscopio de contraste de fases, utilizando una Cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cultivos en Erlenmeyer agitados

Los estudios de influencia de la composición del medio de cultivo y condiciones de cultivo en la producción de PGasas se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 50 ml de medio de cultivo compuesto de sales minerales y alguno de los diversos residuos agroindustriales, según el caso, a razón de 30 g/L, a menos que se indique lo contrario. Previa esterilización en autoclave a 121° C por 20 minutos, los matraces Erlenmeyer se inocularon con la suspensión de conidios para obtener una concentración final de 2×10^5 conidios/ml en el medio de cultivo -salvo que de otra manera se indique- y se incubó a 30° C con agitación orbital a 150 rpm. Se tomaron muestras de 2 ml de los cultivos a diferentes intervalos de tiempo desde el momento de inoculación, éstas se centrifugaron a 3500×g por 15 minutos, y los sobrenadantes resultantes se sometieron a distintas determinaciones analíticas tales como actividad enzimática, azúcares totales solubles y azúcares reductores. Por otro lado, las muestras destinadas a determinación del crecimiento fúngico se obtuvieron por liofilización de los pellets resultantes de centrifugar (3500×g, 15 min) el contenido total de los matraces Erlenmeyer de cada uno de los cultivos.

Diseños experimentales

La detección de componentes del medio de cultivo de influencia significativa en la producción de actividad PGasa, así como la búsqueda de condiciones óptimas de producción de la misma se llevó a cabo por análisis multivariado, siguiendo una metodología de diseño de experimentos. A su vez, dependiendo, entre otras razones, del tipo de información extraída de los resultados de los distintos diseños experimentales aplicados, se utilizó también la estrategia de optimización estudiando una variable por vez (OVAT). Los ensayos correspondientes a los diseños experimentales se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml en todos los casos. A continuación se detallan los diseños

experimentales empleados en cultivos con cada uno de los residuos agroindustriales investigados:

Cultivos sumergidos con cáscara de soja

I) Identificación de factores significativos mediante un diseño factorial fraccionado a dos niveles

Se aplicó un diseño factorial fraccionado 2^{k-p} con el fin de detectar si uno o más componentes del medio de cultivo ejercen un efecto significativo en la producción de actividad PGasa. Decidiendo investigar un número de factores $k=6$ y estableciendo un número de generadores $p=2$, el diseño resultante se redujo a la cuarta parte del diseño completo correspondiente. A su vez, este diseño presenta resolución IV, lo cual significa que permite estimar los efectos principales sin que estos se confundan entre sí o con interacciones dobles. Los factores estudiados y sus respectivos niveles fueron los siguientes: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1-5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.25-1 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.04-0.18 g/L), KH_2PO_4 (0.25-2 g/L), inóculo (5×10^4 - 4×10^5 conidios/ml) y pH inicial (4.4-5.4). Finalizados los ensayos, se recurrió a una gráfica de probabilidad media normal de efectos para evaluar la significancia de cada uno de los efectos estudiados. El diseño experimental se construyó y analizó utilizando el software Design-Expert, versión de prueba 7.0.0 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA).

II) Diseños experimentales de optimización de Doehlert

Una vez identificados los parámetros significativos, se procedió a determinar sus niveles óptimos buscando maximizar la producción enzimática por metodología de superficie de respuesta, aplicando dos diseños sucesivos de Doehlert [Doehlert, 1970]. En estos diseños los factores varían en diferente número de niveles cada uno y el espacio experimental es muestreado de manera uniforme, por lo que los puntos experimentales son equidistantes entre sí. El número de experimentos necesarios en un diseño de Doehlert está determinado por la ecuación $N = k^2 + k + C_0$, donde k es el número de factores y C_0 las réplicas del punto central del diseño. En el presente capítulo el diseño uniforme de Doehlert se utilizó para explorar dos factores, por lo que su representación gráfica conforma un hexágono con un punto central (Fig. 2.1).

Los valores reales de las variables independientes son codificados en base a la siguiente relación lineal entre el valor codificado (X_{cod}) y el valor real (X):

$$X = X_{cod} \frac{\Delta X_r}{\Delta X_{cod}} + X_0$$

donde ΔX_r y ΔX_{cod} son las diferencias entre el valor más alto y más bajo de los valores reales y codificados, respectivamente, mientras que X_0 es el valor real del punto central del diseño.

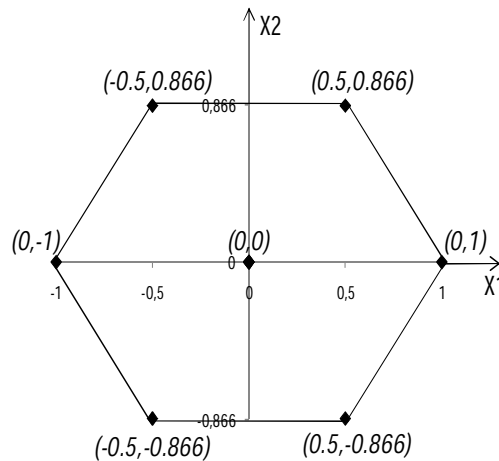


Figura 2.1. Matriz del diseño experimental de Doehlert para dos factores. Entre paréntesis se muestran las coordenadas correspondientes a cada uno de los puntos del diseño.

Una vez realizados los experimentos, se empleó un polinomio de segundo orden para ajustar los datos correspondientes a la respuesta (actividad PGasa):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_{ij}$$

donde Y corresponde a la respuesta, β_0 es la constante del modelo y β_i , β_{ii} , β_{ij} los coeficientes para los efectos lineales, cuadráticos y de interacción, respectivamente.

Para la construcción de los diseños de Doehlert y el análisis de los datos correspondientes se utilizó el software Statgraphics Plus 5.1.

Cultivos sumergidos con cáscara de naranja y pomaza de durazno y damasco

I) Diseños experimentales de optimización de Doehlert

Se emplearon diseños experimentales bifactoriales de Doehlert para maximizar la producción de actividad PGasa en cultivos sumergidos, evaluando

individualmente cáscara de naranja, pomaza de durazno y pomaza de damasco. Los factores elegidos para optimizar la respuesta fueron la concentración del subproducto y la concentración de la fuente primaria de nitrógeno, en este caso el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Esta elección se funda tanto en resultados de trabajos previos [Buyukkileci et al., 2015], como en que los residuos utilizados actúan como única fuente de carbono para el microorganismo a la vez que son capaces de inducir la producción de enzimas pectolíticas dado el elevado contenido de pectina que presentan en su composición.

Tanto en el diseño factorial como en los diseños de superficie de respuesta empleados, los puntos centrales se ensayaron por triplicado para calcular la falta de ajuste de los modelos.

Cultivos en biorreactores de tanque agitado

Cultivos con cáscara de soja

El medio de cultivo optimizado se evaluó en fermentaciones en biorreactores de tanque agitado, procurando reproducir los valores de productividad obtenidos en matraces Erlenmeyer. Se empleó un biorreactor de 2.5 L de capacidad (BioFlo 310; New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA) con 1.5 L de volumen de trabajo. Como agitador se utilizó una turbina de disco con 6 paletas planas (turbina Rushton estándar), mientras que una segunda turbina Rushton fija al eje del motor se posicionó en el espacio de cabeza a modo de rompedor de espuma; adicionalmente, mediante un sensor de espuma posicionado por encima de la turbina superior y conectado al módulo de control del biorreactor se dispensó antiespumante cuando fue necesario. Los biorreactores se operaron a 30° C y 0.6 vvm (volumen de aire por volumen de medio y por minuto) de flujo de aire; la agitación se fijó en 450 rpm.

En un segundo lote de ensayos, la concentración del medio de cultivo se duplicó, y el biorreactor se operó a 0.6 vvm mientras que la agitación se ajustó a un valor mínimo de 300 rpm y se modificó automáticamente según la tensión porcentual de oxígeno disuelto (TOD) cayera por debajo del 20 %, fijando el valor máximo inicialmente en 700 rpm y posteriormente en 800 rpm. Con esta concentración de medio de cultivo se emplearon 2 turbinas Rushton procurando garantizar una adecuada transferencia de oxígeno.

Cada cultivo se inoculó con 2×10^5 conidios/ml. La TOD se monitoreó usando un electrodo de tipo polarográfico (Mettler-Toledo, Columbus, OH, EUA), mientras que las variaciones de pH se registraron con un electrodo de vidrio (Mettler-Toledo). Las presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono a la salida del biorreactor se midieron por medio de analizadores de oxígeno (1100 series, Servomex, Egham, Inglaterra) y de dióxido de carbono (PIR-2000, Horiba, Kyoto, Japón), respectivamente.

Se tomaron periódicamente muestras de aproximadamente 10 ml de los biorreactores, las cuales se centrifugaron a $3500 \times g$ por 15 minutos, y los sobrenadantes obtenidos se sometieron a determinaciones de actividad PGasa, xilanasa (XYLasa), endo-glucanasa, contenido de azúcares totales solubles, azúcares reductores, concentración de glucosa y concentración de amonio.

Cultivos con cáscara de naranja y pomaza de damasco

Se realizaron cultivos empleando como fuente de carbono y energía una mezcla de cáscara de naranja molida y pomaza de damasco. Las fermentaciones se llevaron a cabo en un biorreactor con vasos de 1 L de capacidad (BIOSTAT QPlus-6, Sartorius, Gottingen, Alemania) y 700 ml de volumen de trabajo, ensayando tres condiciones distintas definidas por la configuración operacional de la agitación y aireación: a flujo de aire y velocidad de agitación constantes (1 vvm y 600 rpm, condición A), a flujo de aire constante (1 vvm) y velocidad de agitación controlada por la TOD (condición B), y a velocidad de agitación constante (600 rpm) y flujo de aire controlado por la TOD (condición C). Los biorreactores se inocularon con 1.4×10^5 conidios/ml. La TOD y el pH se monitorearon y registraron tal como se explica más arriba para los cultivos realizados con cáscaras de soja.

Se tomaron periódicamente muestras de aproximadamente 10 ml, las cuales se centrifugaron ($3500 \times g$, 15 min) y a los sobrenadantes resultantes se les determinó actividad PGasa, concentración de azúcares totales solubles y azúcares reductores.

Determinaciones analíticas

Azúcares reductores: se realizó siguiendo la metodología de Somogyi-Nelson [Nelson, 1944; Somogyi, 1952]. Para ello, se adicionaron 200 μ l del reactivo de

Somogyi a igual volumen de muestra de cultivo, y la solución se llevó a ebullición por 10 minutos. Acto seguido, cada tubo de reacción se dejó enfriar durante 10 minutos y se agregaron 200 μ l del reactivo de Nelson. La mezcla resultante se agitó en vortex, se dejó reposar durante 30 minutos y, previo agregado de 1.80 ml de H₂O destilada, se procedió a determinar la absorbancia a 660 nm.

Para el caso particular de la determinación de azúcares reductores durante los cultivos con cáscaras de soja, se utilizó como solución patrón una mezcla 2/2/1 de xilosa, arabinosa y manosa con el fin de reproducir la composición aproximada de monosacáridos solubles encontrada después de un ciclo de esterilización regular por autoclave, y debida a la hidrólisis ácida de los polisacáridos presentes en las cáscaras de soja [Schirmer-Michel et al., 2008].

Azúcares totales solubles: el ensayo se realizó por la técnica del fenol/ácido sulfúrico [DuBois et al., 1956], empleando como patrón distintas diluciones de una solución de sacarosa de concentración conocida. Metodológicamente, se mezcló un volumen de 0.5 ml de muestra con igual cantidad de una solución de fenol al 5 % (p/v) y posteriormente se agregó a la mezcla 2.5 ml de H₂SO₄ al 96 %. Los tubos de reacción se dejaron reposar por 20 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la lectura de absorbancia a 490 nm.

Glucosa: se empleó el kit enzimático comercial glucosa oxidasa/peroxidasa [Bergmeyer & Bernt, 1965], siguiendo las instrucciones del fabricante (Wiener, Rosario, Argentina).

Actividad PGasa: se determinó siguiendo el protocolo descrito en Cavalitto et al. [1999], con ligeras modificaciones, principalmente en los volúmenes utilizados. A saber, se incubaron 180 μ l de una solución 2 g/L de APG con 20 μ l de una dilución apropiada de muestra enzimática durante 10 minutos en un baño termostatzado a 35° C, y posteriormente los tubos de reacción se enfriaron en un baño de agua/hielo. Acto seguido, la concentración de azúcares reductores se determinó siguiendo la metodología de Somogyi-Nelson [Nelson, 1944; Somogyi, 1952] y empleando AGA como patrón. El APG, AGA y las diluciones de la muestra enzimática se prepararon en buffer ácido cítrico 12.5 mM - Na₂HPO₄ 6.25 mM (BCP), ajustado a pH 5.0. Una unidad de actividad PGasa se definió como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de grupos reductores (medido como AGA) por minuto.

Todas las determinaciones de actividad enzimática se realizaron por triplicado y en todos los casos se realizó un blanco de reactivos y muestra agregando la enzima posteriormente al reactivo de Somogyi, en tubos previamente incubados con el sustrato respectivo durante el período de tiempo y temperatura correspondientes a cada ensayo.

Actividad XYLasa: se ensayó realizando algunas modificaciones al método descrito por Bailey [1992]. Se incubaron 180 μ l de una solución 2.5 g/L de xilano en BCP (12.5 mM / 6.25 mM), pre-ajustado a pH 5.3, con 20 μ l de muestra enzimática durante 10 minutos en un baño termostatzado a 50° C y posteriormente los tubos de reacción se enfriaron en un baño de agua-hielo para detener la reacción y proceder con la determinación de grupos reductores por Somogyi-Nelson [Nelson, 1944; Somogyi, 1952]. El estándar empleado para estas determinaciones fue una solución de xilosa en BCP a pH 5.3. Se definió una unidad de actividad XYLasa como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de grupos reductores (medido como xilosa) por minuto.

Actividad endo-glucanasa: las determinaciones se realizaron en base a uno de los métodos descritos en Wood & Bhat [1988], con algunas modificaciones. Se incubaron 180 μ l de una solución 2.5 g/L de carboximetilcelulosa en BCP (12.5 mM / 6.25 mM), pre-ajustado a pH 4.0, con 20 μ l de muestra enzimática durante 60 minutos en un baño termostatzado a 50° C y posteriormente los tubos de reacción se enfriaron en un baño de agua-hielo para detener la reacción y proceder con la determinación de grupos reductores por Somogyi-Nelson [Nelson, 1944; Somogyi, 1952]. Se empleó glucosa preparada en BCP a pH 4.0 como solución patrón. Una unidad de actividad endo-glucanasa se definió como la cantidad de enzima necesaria que libera grupos reductores equivalentes a 1 μ mol de glucosa por minuto.

Amonio: el contenido de nitrógeno presente en las muestras como amonio se determinó espectrofotométricamente a 625 nm siguiendo el protocolo de Chaney & Marbach [1962], empleando soluciones de amonio de concentración conocida como estándar.

Glucosamina: el crecimiento de *A. sojae* en el medio de cultivo conteniendo cáscaras de soja se estimó por conversión de la quitina fúngica en glucosamina vía degradación alcalina a 130° C, seguida de una reacción de desaminación con ácido nitroso de la glucosamina obtenida y la determinación colorimétrica del

aldehído resultante por reacción con 3-metil-2-benzotiazolinonahidrazona [Ride & Drysdale, 1972]. Se utilizó como patrón una solución de glucosamina de concentración conocida.

Análisis de imágenes por microscopía

La morfología de *A. sojae* creciendo en cultivos líquidos con cáscaras de soja se analizó utilizando un microscopio confocal láser de barrido (Leica TCS SP5; Leica, Wetzlar, Alemania). A su vez, cuando desarrollo del microorganismo generó aglomerados cuasi-esféricos de hifas (pellets) íntegramente visualizables dentro del campo visual del microscopio, el tamaño de estos se determinó a través del examen manual de fotografías de al menos 10 pellets por muestra. La dimensión medida fue la proyección bidimensional correspondiente a cada pellet, empleando para este fin el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

Resultados y discusión

Valoración del potencial de varios subproductos agroindustriales para la producción de PGasa por A. sojae

Con el fin de seleccionar uno o varios residuos agroindustriales como fuente de carbono y energía (FCE) para posteriores estudios de producción de PGasa, se realizó un lote de cultivos por cada residuo utilizado en medio mineral con la siguiente composición (Tabla 2.1): FCE (30 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.6 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 mg/L), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.6 mg/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.4 mg/L), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2.0 mg/L). Se emplearon los siguientes residuos, preparados tal como se indica en la sección “**Reactivos**”: cáscaras de soja, cáscaras de naranja, cáscaras de limón, cáscaras de lima, orujo de uvas, pomaza de peras.

Tabla 2.1. Medio de cultivo base empleado en los estudios de valoración de distintos subproductos agroindustriales.

Componente	Cantidad (g/L)
Residuo ^a	30
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.6
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
KH ₂ PO ₄	1.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0 x 10 ⁻³
MnSO ₄ ·7H ₂ O	1.6 x 10 ⁻³
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4 x 10 ⁻³
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.0 x 10 ⁻³

^aResiduos: cáscaras de soja, cáscaras de naranja, cáscaras de limón, cáscaras de lima, orujo de uvas, pomaza de peras.

El perfil temporal de producción enzimática permite observar que *A. sojae* produjo actividad PGasa con todos los subproductos empleados como fuente única de carbono y energía (Fig. 2.2 A), si bien la magnitud de la producción se vio fuertemente afectada según el subproducto utilizado. Puede observarse una tendencia más o menos general al alcance de valores máximos de producción entre las 132 y 180 horas de cultivo.

La cáscara de lima resultó ser sustrato con el que *A. sojae* produjo mayor actividad PGasa (69 U/ml), mientras que los cultivos con cáscara de limón y cáscara de naranja también arrojaron valores elevados (56 y 61 U/ml, respectivamente). El perfil de evolución del pH a lo largo del tiempo muestra que los cultivos en los que se utilizó orujo de uva alcanzaron valores de pH de alrededor de 9.5, a diferencia de aquellos empleando el resto de los residuos en donde la tendencia observada fue una disminución del pH hacia valores ácidos (Fig. 2.2 B); así, el comportamiento diferencial del pH de los cultivos con orujo de uva parece estar conectado con los valores sumamente bajos de actividad PGasa obtenidos en estos cultivos (contrario a lo que pudiera interpretarse de la Fig. 2.2 A, los cultivos con orujo de uva fueron positivos para actividad PGasa, si bien los valores difieren del resto en casi tres órdenes de magnitud).

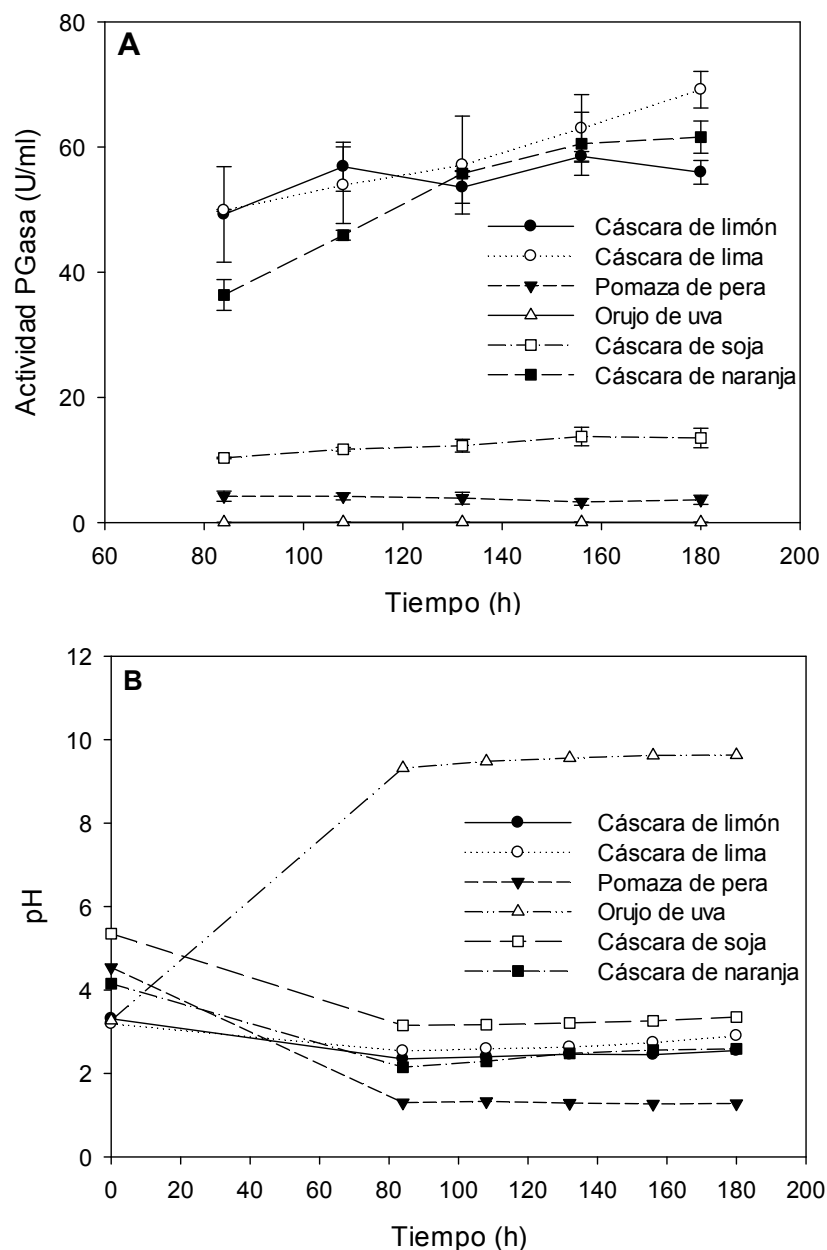


Figura 2.2. Perfil de actividad PGasa (A) y pH del cultivo (B) en el tiempo, empleando distintos subproductos agroindustriales como fuente única de carbono y energía. Las barras de error representan el desvío estándar calculado de tres cultivos réplica.

Cabe destacar que el pH inicial de todos los cultivos, resultante de mezclar cada uno de los subproductos con el medio mineral sin ajustar posteriormente la acidez de los mismos, osciló entre 3.2 y 5.3. En algunos trabajos se relaciona la disminución del pH observada durante las primeras fases en fermentaciones sumergidas con microorganismos del género *Aspergillus*, con la producción de ácidos orgánicos [Botella et al., 2005; Botella et al., 2007; Martínez-Trujillo et al.,

2009], y resulta evidente que este fenómeno es consecuencia del metabolismo de estos hongos filamentosos durante su fase de crecimiento. Sin embargo, en lo que respecta al incremento del pH evidenciado en los cultivos con orujo de uva, el fenómeno parece ser una característica intrínseca de cultivos con este residuo en particular, habiéndose reportado similar comportamiento en fermentaciones sumergidas de *A. awamori* con orujo de uva [Díaz et al., 2012]. Comportamiento inverso presentaron los cultivos con pomaza de pera, los cuales alcanzaron valores de pH altamente ácidos, cercanos 1.3, hecho que derivó en niveles bajos de actividad PGasa (alrededor de 3.5 U/ml). Para resumir, del análisis de los gráficos de la Fig. 2.2 se desprende que, aunque no necesariamente sea la causa de los valores de actividad obtenidos, la producción de PGasa por *A. sojae* ocurre fundamentalmente en condiciones de acidez moderada ($2 < \text{pH} < 6$).

En cuanto a la cáscara de soja, si bien se obtuvieron niveles de actividad PGasa intermedios (aproximadamente 11 U/ml), el atractivo de este subproducto radica en las enormes cantidades generadas anualmente en Argentina y en que como sustrato para la producción microbiana de productos de valor agregado no ha sido estudiado tan extensamente como sí han sido varios residuos de la industria citrícola, tales como la cáscara de naranja, limón y lima. El conjunto de estas características definió la elección de la cáscara de soja como fuente de carbono y energía con la que se realizaron los estudios de optimización de la producción de PGasas por *A. sojae*, como se detalla a continuación.

Optimización de la composición del medio en cultivos con cáscara de soja

Efecto de la concentración de ciertos iones metálicos

Con el fin de estudiar el efecto de la concentración de los iones metálicos Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} , presentes en el medio base detallado en la Tabla 2.1, se realizó una serie de experimentos en los que se probó, por duplicado, las siguientes concentraciones de los mismos: 0.02 X, 0.2 X, 0.1 X, 1 X (concentración original) y 5 X. Teniendo en cuenta la cinética de producción de PGasa atestiguada previamente (Fig. 2.2 A), se tomaron muestras a las 108 y 156 horas de cultivo y los resultados de las determinaciones de actividad se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). Dado que el valor calculado del estadístico F es menor que el valor de F crítico ($\alpha = 0.05$) en los ANOVA correspondientes a las muestras de ambos tiempos de cultivo (Tabla 2.2), puede descartarse que los iones metálicos

ejerzan un efecto significativo en la producción de actividad PGasa en las concentraciones ensayadas.

Tabla 2.2. ANOVA del efecto de la concentración de los compuestos FeSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 y CoCl_2 a los valores 0.02 X, 0.2 X, 0.1 X, 1X y 5 X respecto al medio base.

Variación	SC	GL	CM	F	Probabilidad	F crítico ^a
<i>Datos recabados a las 108 horas de cultivo</i>						
Entre grupos	13.19	4	3.30	1.92	0.24	5.19
Dentro de los grupos	8.59	5	1.72			
Total	21.78	9				
<i>Datos recabados a las 156 horas de cultivo</i>						
Entre grupos	15.74	4	3.91	2.12	0.21	5.19
Dentro de los grupos	9.22	5	1.84			
Total	24.86	9				

SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: suma de cuadrados media, F: estadístico F. ^a $\alpha = 0.05$

A partir de esta información, se decidió realizar un ensayo adicional en el cual se cultivó al microorganismo en el medio de cultivo prescindiendo de los iones metálicos en cuestión. Dado que los valores de actividad PGasa obtenidos en este ensayo fueron similares tanto en presencia como en ausencia de estos compuestos, se concluyó que no eran necesarios para la producción enzimática por lo que se optó por descartar a los iones Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} en la formulación del medio de cultivo para posteriores ensayos. Es probable que los requerimientos nutricionales de *A. sojae* en dichos iones sea cubierta parcial o completamente por el aporte proveniente de la cáscara de soja. De hecho, Cassales et al. [2011] informaron que el Mn y el Zn se encuentran entre los minerales mayoritarios hallados en las cáscaras de soja, con concentraciones en el orden de las utilizadas en el medio de cultivo en el presente trabajo. Debido a que no era del interés del presente trabajo, no se determinó la presencia de los metales en el medio de cultivo.

Identificación de factores significativos

Siguiendo con los estudios de optimización, se empleó un diseño factorial fraccionado a 2 niveles para estudiar el efecto de 6 variables, tal como se detalla en la sección “**Diseños experimentales**”. Dados los resultados obtenidos anteriormente, se decidió evaluar la respuesta del modelo a las 108 horas de cultivo.

Tabla 2.3. Diseño factorial fraccionado y actividad PGasa, determinada a las 108 h de cultivo.

N ^o _a	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	Inóculo (10 ⁵ /ml)	pH _i ^b	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Actividad PGasa (U/ml)
1	0.25 (-) ^c	0.04 (-)	0.25 (-)	4.00 (+)	4.45 (-)	5.00 (+)	11.37
2	1.00 (+)	0.04 (-)	2.00 (+)	4.00 (+)	4.45 (-)	1.00 (-)	8.72
3	0.63 (0)	0.11 (0)	1.13 (0)	2.25 (0)	4.95(0)	3.00 (0)	12.22
4	0.25 (-)	0.18 (+)	2.00 (+)	4.00 (+)	4.45 (-)	5.00 (+)	12.43
5	0.63 (0)	0.11 (0)	1.13 (0)	2.25 (0)	4.95(0)	3.00 (0)	11.79
6	1.00 (+)	0.04 (-)	0.25 (-)	0.50 (-)	5.45(+)	1.00 (-)	5.34
7	0.25 (-)	0.04 (-)	0.25 (-)	0.50 (-)	4.45 (-)	1.00 (-)	8.08
8	0.25 (-)	0.18 (+)	0.25 (-)	4.00 (+)	5.45(+)	1.00 (-)	4.80
9	0.25 (-)	0.04 (-)	2.00 (+)	4.00 (+)	5.45(+)	1.00 (-)	5.25
10	1.00 (+)	0.04 (-)	2.00 (+)	0.50 (-)	4.45 (-)	5.00 (+)	11.42
11	0.25 (-)	0.18 (+)	2.00 (+)	0.50 (-)	4.45 (-)	1.00 (-)	9.28
12	0.25 (-)	0.04 (-)	2.00 (+)	0.50 (-)	5.45(+)	5.00 (+)	10.47
13	1.00 (+)	0.18 (+)	0.25 (-)	4.00 (+)	4.45 (-)	1.00 (-)	8.36
14	1.00 (+)	0.18 (+)	2.00 (+)	4.00 (+)	5.45(+)	5.00 (+)	11.47
15	1.00 (+)	0.18 (+)	0.25 (-)	0.50 (-)	4.45 (-)	5.00 (+)	10.72
16	1.00 (+)	0.18 (+)	2.00 (+)	0.50 (-)	5.45(+)	1.00 (-)	4.88
17	1.00 (+)	0.04 (-)	0.25 (-)	4.00 (+)	5.45(+)	5.00 (+)	10.82
18	0.63 (0)	0.11 (0)	1.13 (0)	2.25 (0)	4.95(0)	3.00 (0)	11.49
19	0.25 (-)	0.18 (+)	0.25 (-)	0.50 (-)	5.45(+)	5.00 (+)	11.25

^a: número de experimento; ^b: pH inicial del medio de cultivo; ^c: factores codificados

El diseño implicó la realización de 19 experimentos, obteniéndose los valores más elevados (12.43 U/ml) y más bajos (4.80 U/ml) de actividad PGasa a partir de

las condiciones ensayadas en el cuarto y octavo experimento, respectivamente (Tabla 2.3). El gráfico de probabilidad normal de los efectos exhibido en la Fig. 2.3 señala que el pH inicial (de aquí en adelante simplemente pHi) y la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ son los efectos principales evaluados que modifican significativamente la actividad PGasa, puesto que se alejan notoriamente de la línea recta y por ende no provienen de una distribución gaussiana. Además, a partir de la posición de dichos efectos a un lado o al otro de la línea recta que trazan los demás factores se desprende que la producción enzimática se ve favorecida por valores de pHi más bajos y concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mayores que las ensayadas en el punto central del diseño.

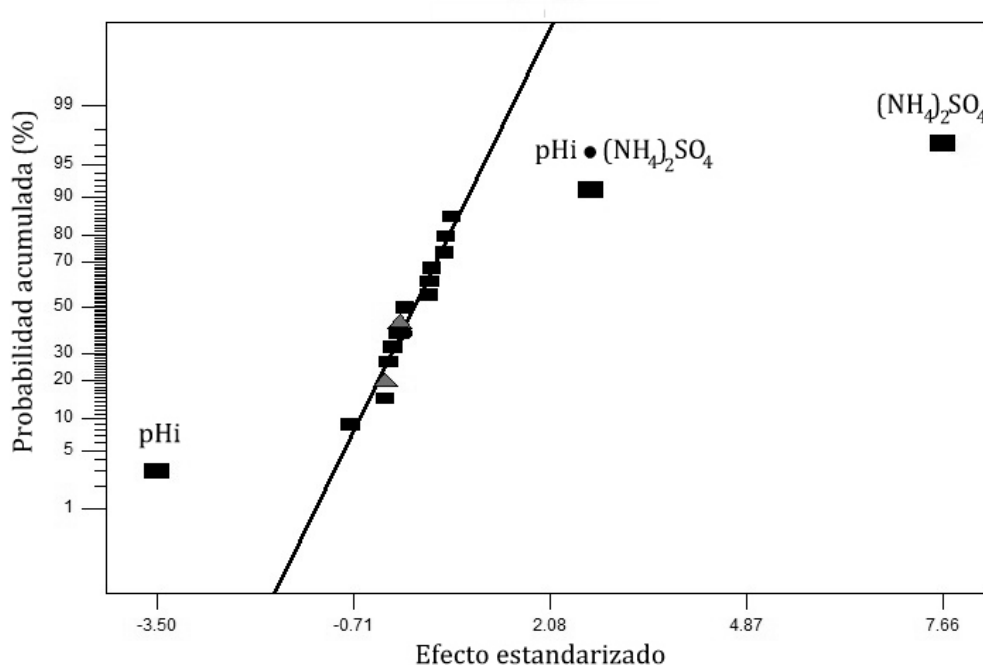


Figura 2.3. Diagrama de probabilidad normal para evaluar la significancia del efecto de los parámetros ensayados con el diseño factorial fraccionado, en la producción de actividad PGasa.

La característica más ventajosa de los diseños factoriales fraccionados, como el empleado en este caso, es que permite reducir de manera importante el número de tratamientos experimentales. Sin embargo, a causa del fraccionamiento también se ve reducida la resolución del diseño, lo que quiere decir que los efectos de los factores se confunden. En otras palabras, el análisis del diseño indica que el efecto significativo puede corresponder a más de un factor (o a más de una interacción entre factores) y se debe recurrir a información adicional para la

interpretación los resultados. En sintonía con lo anterior, el gráfico de probabilidad normal denota un tercer efecto significativo, el cual sería interacción doble entre el pH_i y la concentración de (NH₄)₂SO₄ ya que, si bien se confunde con otras interacciones debido al poder de resolución del diseño experimental en cuestión, es la alternativa más razonable dados los demás efectos relevantes identificados.

Los efectos seleccionados se evaluaron a su vez mediante un ANOVA (Tabla 2.4), confirmando que el pH_i, la concentración de (NH₄)₂SO₄ y la interacción entre ambos afectan significativamente la producción enzimática ($p < 0.0001$). El elevado valor del R^2 del modelo y el valor p para la prueba de falta de ajuste indican que el modelo puede predecir más del 96 % de los datos experimentales y que se ajusta adecuadamente a los mismos.

Tabla 2.4. ANOVA del modelo seleccionado a partir de los resultados del diseño factorial fraccionado.

Parámetro	SC	GL	CM	Estadístico F	Valor p
pH _i	48.99	1	48.99	67.58	< 0.0001
(NH ₄) ₂ SO ₄	234.63	1	234.63	323.70	< 0.0001
pH _i ·(NH ₄) ₂ SO ₄	28.31	1	28.31	39.06	< 0.0001
Curvatura	59.61	1	59.61	82.24	< 0.0001
Residuo					
Falta de ajuste	9.35	12	0.78	1.96	0.3871
Error puro	0.80	2	0.40		
Total	381.69	18			
$R^2 = 0.9683$		$R^2_{aj} = 0.9617$			

SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: suma de cuadrados media

Diseños de superficie de respuesta de Doehlert y ajuste fino del pH_i

Una vez identificadas las variables significativas, se empleó un diseño de Doehlert que constó de 9 experimentos, seleccionando un entorno experimental demarcado por concentraciones más elevadas de (NH₄)₂SO₄ y valores más bajos de pH_i, de acuerdo a los resultados anteriores (Tabla 2.5). El tamaño del inóculo y los componentes restantes del medio de cultivo, de influencia no significativa, se mantuvieron al nivel basal.

Tabla 2.5. Primer diseño de Doehlert y actividad PGasa, determinada a las 108 h de cultivo.

N ^o ^a	pHi ^b	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Actividad PGasa (U/ml)
1	5.60 (1) ^c	7 (0)	8.22
2	4.85 (0.5)	12.20 (0.867)	7.22
3	3.35 (-0.5)	12.20 (0.867)	12.53
4	2.60 (-1)	7 (0)	26.94
5	3.35 (-0.5)	1.80 (-0.867)	10.66
6	4.85 (0.5)	1.80 (-0.867)	3.67
7	4.10 (0)	7 (0)	9.08
8	4.10 (0)	7 (0)	8.97
9	4.10 (0)	7 (0)	9.48

^a: número de experimento; ^b: pH inicial del medio de cultivo; ^c: factores codificados

El experimento en el cual se ensayó la condición más ácida arrojó valores de actividad PGasa de 26.94 U/ml y prácticamente duplicó los niveles actividad obtenidos con las demás condiciones ensayadas. Mediante la aplicación de un ANOVA se seleccionaron los parámetros significativos y se incluyeron en el modelo (Tabla 2.6), con el cual se puede explicar el 97.75 % de los resultados experimentales a juzgar por su valor de R². El ANOVA arrojó que el pHi y la concentración de (NH₄)₂SO₄ poseen un efecto significativo sobre la producción enzimática, así como también lo poseen sus respectivos términos cuadráticos.

Tabla 2.6. ANOVA del modelo seleccionado a partir de los resultados del primer diseño de Doehlert.

Parámetro	SC	GL	CM	Estadístico F	Valor p
pHi	206.17	1	206.17	2862.18	0.0003
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.34	1	7.34	101.95	0.0097
pHi.pHi	84.74	1	84.74	1176.39	0.0008
(NH ₄) ₂ SO ₄ . (NH ₄) ₂ SO ₄	16.22	1	16.22	225.19	0.0044
Falta de ajuste	7.57	2	3.79	52.58	0.0187
Error puro	0.14	2	0.072		
Total	341.85	8			
R ² = 0.9775		R ² _{aj} = 0.9548			

SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: suma de cuadrados media

A partir de los coeficientes de regresión del modelo (Tabla 2.7) se empleó la ecuación polinómica correspondiente para construir la superficie de respuesta (Fig. 2.4). En la gráfica se aprecia el importante efecto que el pH_i ejerce en la actividad PGasa dentro del entorno experimental estudiado, lo cual también denota el bajo valor p de los términos lineal y cuadrático del pH_i (Tabla 2.6), y también puede verse que no se alcanzó el pico de la superficie, sino que el mismo se encontraría a valores aún más bajos de pH_i.

Tabla 2.7. Coeficientes del polinomio que describe la producción de actividad PGasa según los resultados del primer diseño de Doehlert.

Término de la ecuación	Coefficiente en valor codificado	Coefficiente en valor real
Constante	9.18	87.80
pH _i	-16.58	- 36.15
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.71	1.69
pH _i .pH _i	16.81	3.73
(NH ₄) ₂ SO ₄ . (NH ₄) ₂ SO ₄	-5.52	-0.10

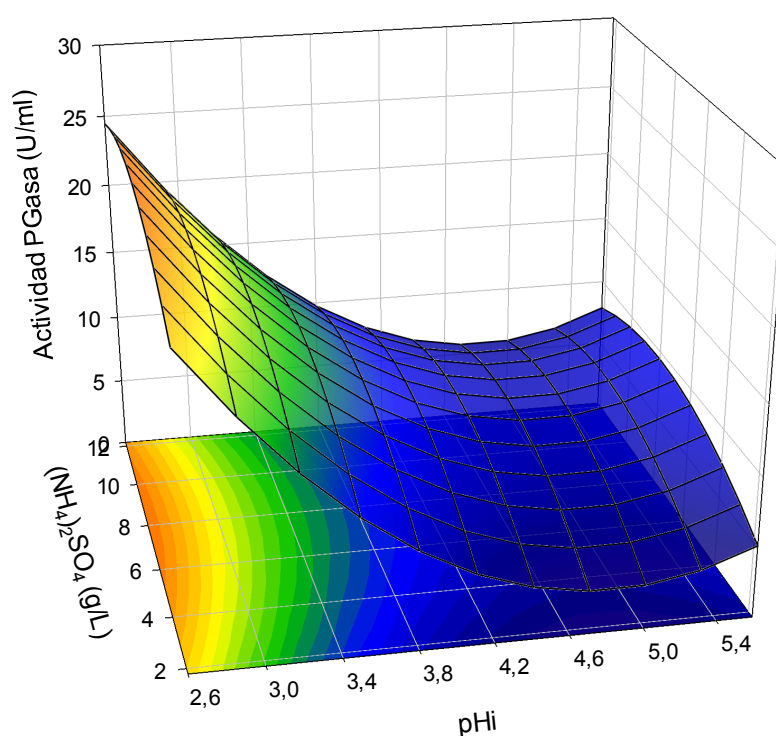


Figura 2.4. Superficie de respuesta obtenida a partir del primer diseño de Doehlert, la cual muestra el efecto del pH inicial del medio de cultivo y la concentración de (NH₄)₂SO₄ en la producción de actividad PGasa.

Si bien el modelo obtenido no se ajusta satisfactoriamente a los datos experimentales (p valor de falta de ajuste < 0.05, Tabla 2.6), éste resulta igualmente útil para marcar la tendencia de la evolución de la actividad PGasa hacia un entorno experimental de mayor acidez en donde se pudiera hallar la máxima producción enzimática.

Antes de continuar con el siguiente diseño, se decidió realizar un experimento adicional variando únicamente el pH_i con la finalidad de delimitar el entorno del diseño experimental ulterior y que éste contenga la condición de máxima respuesta dentro de sus límites. Fijando entonces la concentración de (NH₄)₂SO₄ en 10 g/L se ensayaron, por duplicado, las siguientes tres condiciones diferentes de pH_i: 2.60, 2.20 y 1.80. Puede observarse en la Tabla 2.8 cómo la actividad PGasa a pH_i 2.20 cae casi al 50 % del valor obtenido a pH_i 2.60, mientras que a pH_i 1.80 la producción enzimática se reduce a menos del 10%. Por ende, el máximo de producción de actividad PGasa se encontraría en torno un valor de pH_i de 2.60.

Tabla 2.8. Actividad PGasa en ensayos a diferente valor de pH inicial del medio de cultivo.

pH inicial del medio de cultivo (pH _i)	Actividad PGasa (%)
2.60	100.00 ± 8.59
2.20	54.74 ± 10.15
1.80	7.19 ± 2.24

Los valores se presentan como porcentaje respecto al valor obtenido a pH_i 2.60 y corresponden a la media de dos ensayos independientes ± desvío estándar.

De acuerdo a la información obtenida del experimento anterior, se realizó un segundo diseño experimental de Doehlert centrado en la condición de pH con la que se obtuvo el mejor rendimiento en actividad enzimática. El entorno experimental estuvo delimitado por valores de pH_i entre 2.40 y 2.80, mientras que la concentración de (NH₄)₂SO₄ a ensayar se amplió levemente hacia valores más elevados (Tabla 2.9).

El modelo creado resultó adecuado para representar los datos y explicar más del 97 % de los resultados experimentales (Tabla 2.10). El ANOVA para el modelo seleccionado muestra que el comportamiento de la respuesta se rige, en el entorno experimental ensayado, casi enteramente por el pH_i y que la concentración de (NH₄)₂SO₄ resulta no significativa –el correspondiente término

lineal se incluye en el modelo únicamente porque el efecto de interacción entre el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el pH_i puede considerarse significativo dado su valor p -.

Tabla 2.9. Segundo diseño de Doehlert y actividad PGasa, determinada a las 108 horas de cultivo.

N ^o _a	pH _i ^b	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Actividad PGasa (U/ml)
1	2.80 (1) ^c	10 (0)	18.63
2	2.70 (0.5)	17.80 (0.867)	25.45
3	2.50 (-0.5)	17.80 (0.867)	19.22
4	2.40 (-1)	10 (0)	15.97
5	2.50 (-0.5)	2.20 (-0.867)	24.45
6	2.70 (0.5)	2.20 (-0.867)	23.94
7	2.60 (0)	10 (0)	26.04
8	2.60 (0)	10 (0)	25.10
9	2.60 (0)	10 (0)	26.70

a: número de experimento; b: pH inicial del medio de cultivo; c: factores codificados

Tabla 2.10. ANOVA del modelo seleccionado a partir de los resultados del segundo diseño de Doehlert.

Parámetro	SC	GL	CM	Estadístico F	Valor p
pH _i	10.16	1	10.16	15.71	0.0584
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.46	1	3.46	5.35	0.1466
pH _i .pH _i	90.48	1	90.48	139.95	0.0071
pH _i .. (NH ₄) ₂ SO ₄	11.36	1	11.36	17.57	0.0528
Falta de ajuste	2.14	2	1.07	1.65	0.3801
Error puro	1.29	2	0.65		
Total	118.89	8			
R ² = 0.9712		R ² _{aj} = 0.9423			

SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: suma de cuadrados media

Los coeficientes de regresión del modelo utilizados para representar la superficie de respuesta se muestran en la Tabla 2.11. Puede verse que el gráfico muestra una cordillera estacionaria, es decir, una superficie que presenta una región óptima en el centro a lo largo de una dirección definida, en este caso en torno a un valor de pH_i de 2.60 (Fig. 2.5). Se observa a su vez que la zona de

máxima actividad PGasa desciende hacia valores de pH_i mayores o menores respecto de pH_i 2.60 y que el comportamiento de la superficie es prácticamente independiente de la concentración de (NH₄)₂SO₄, lo cual a su vez denota su efecto comparativamente menor respecto del pH_i, como se había discutido más arriba.

Tabla 2.11. Coeficientes del polinomio que describe la producción de actividad PGasa según los resultados del segundo diseño de Doehlert.

Término de la ecuación	Coeficiente en valor codificado	Coeficiente en valor real
Constante	25.67	-1378.70
pH _i	3.68	1093.62
(NH ₄) ₂ SO ₄	-1.86	-5.74
pH _i .pH _i	-17.02	-212.70
pH _i . (NH ₄) ₂ SO ₄	6.74	2.16

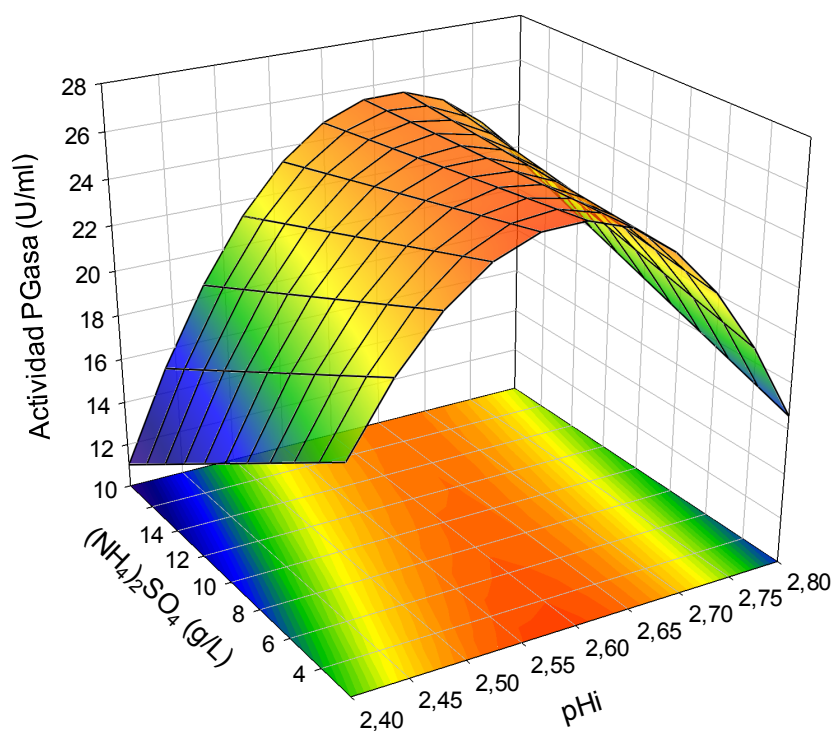


Figura 2.5. Superficie de respuesta obtenida a partir del segundo diseño de Doehlert, la cual muestra el efecto del pH inicial del medio de cultivo y la concentración de (NH₄)₂SO₄ en la producción de actividad PGasa.

El valor experimental máximo de actividad PGasa, alrededor de 26 U/ml, provino de los cultivos realizados de acuerdo al punto central del diseño y

coincidió con el obtenido en prácticamente las mismas condiciones cuando se realizó el primer diseño de Doehlert.

Con el fin de validar el desarrollo metodológico y estadístico llevado a cabo para la optimización de la producción de actividad PGasa, se eligieron cuatro composiciones aleatorias del medio de cultivo en donde se varió la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ así como también el pH_i. Se determinaron las actividades enzimáticas predichas por el modelo para cada situación y se compararon con las actividades experimentales, calculando la diferencia porcentual entre ambos valores (Tabla 2.12). Se considera que para procesos biológicos, una diferencia de alrededor del 20 % entre los valores experimentales y los valores predichos por un modelo resultan aceptables para considerar a ese modelo válido [Kiran et al., 1999]. Dado que las diferencias observadas son menores que ese valor, se puede concluir que el modelo propuesto describe de manera adecuada la influencia las variables estudiadas sobre la producción de actividad PGasa de *A. sojae* con el medio de cultivo y en las condiciones empleadas.

Tabla 2.12. Diferencia porcentual entre la actividad PGasa experimental y la predicha por el modelo.

Condición	pH _i	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Actividad PGasa experimental (U/ml)	Actividad PGasa predicha (U/ml)	Diferencia (%)
1	2.70	6	27.31	24.07	13.46
Duplicado			26.88		11.67
2	2.80	12	23.59	19.62	20.23
Duplicado			22.96		17.02
3	2.50	15	22.11	20.94	5.95
Duplicado			23.53		12.37

El efecto positivo de elevar las concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, puesto de manifiesto con el diseño factorial fraccionado, probablemente sea debido a limitaciones metabólicas por un déficit en fuente de nitrógeno de fácil asimilación, ya que cuando se incrementaron las concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en los diseños de Doehlert la influencia de esta sal en la actividad PGasa disminuyó considerablemente hasta finalmente ser calificada como no significativa. El efecto del pH_i en la actividad PGasa, en cambio, parece ser de naturaleza más compleja ya que podría involucrar a varios procesos fisicoquímicos y biológicos. Los

procesos de molienda y esterilización por vapor húmedo en autoclave a los que se someten las cáscaras de soja desorganizan sus micro-estructuras e incrementan la concentración de pentosas solubles, a la vez que exponen las microfibrillas de celulosa como resultado de la hidrólisis de la capa externa que las recubre [Corredor et al., 2008]. En el presente estudio se ha observado que la hidrólisis, a su vez, se acrecienta por la acción de ácidos fuertes (Fig. 2.6).

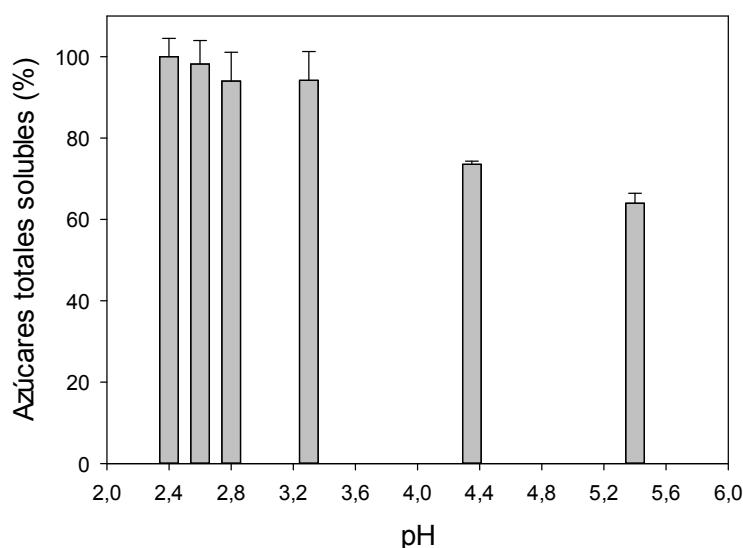


Figura 2.6. Azúcares totales solubles graficados en función del pH inicial del medio de cultivo. El pH se ajustó agregando cantidades necesarias de HCl para alcanzar los valores deseados. Nótese que los valores de pH se eligieron para que coincidan con los ensayados en los estudios de optimización. Las determinaciones se realizaron post esterilización por autoclave (121° C, 20 minutos), y se expresaron como porcentaje respecto al valor más elevado. Las barras de error representan el desvío estándar calculado con tres experimentos.

Se conjeturó entonces que un mayor contenido en azúcares solubles al inicio de los cultivos realizados a pH ácido conllevaría a un mayor crecimiento del microorganismo, lo cual contribuiría a explicar la máxima actividad PGasa alcanzada a valores de pH_i en torno a 2.60. Para poner a prueba esta hipótesis se evaluó el crecimiento fúngico con el medio de cultivo optimizado (30 g/L cáscaras, 7 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L MgSO₄·7H₂O, 1 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L CaCl₂·2H₂O). La dificultad para evaluar el crecimiento fúngico en medios de cultivo como los utilizados en estos estudios radica en que las partículas no solubles interfieren con los métodos gravimétricos empleados normalmente para la cuantificación de biomasa, tales como el peso seco. El seguimiento de la evolución del amonio a lo

largo del cultivo tampoco arrojó resultados concluyentes que permitieran estimar el crecimiento microbiano. Los mejores resultados se obtuvieron siguiendo la evolución temporal del contenido de glucosamina en los cultivos, y en la Tabla 2.13 se muestran los resultados para dos lotes de cultivos realizados a valores de pHi de 5.40 y 2.60. En ambos casos se alcanzó una meseta cerca de las 110 horas y los cultivos llevados a cabo a un pHi de 5.40 mostraron un contenido en glucosamina similar o más elevado que sus pares a pHi 2.60; como consecuencia, *A. sojae* cultivado a un pHi de 2.60 presentó niveles más altos de producción por unidad de biomasa fúngica.

Tabla 2.13. Crecimiento fúngico y actividad PGasa por gramo de glucosamina, correspondiente a *A. sojae* cultivado en el medio optimizado pre-ajustado a pH 5.40 y 2.60 antes de la inoculación.

Tiempo de cultivo (h)	Crecimiento fúngico (mg glucosamina/ml)		Producción de actividad PGasa (U/g glucosamina)	
	pHi 5.40	pHi 2.60	pHi 5.40	pHi 2.60
60	173.8 ± 51	189.2 ± 7.7	62.1 ± 20	69.3 ± 5.3
84	275.1 ± 10	232.4 ± 22	43.9 ± 4.8	101.9 ± 13
110	378.0 ± 93	322.6 ± 18	40.0 ± 9.8	84.4 ± 10
135	381.4 ± 2.2	306.9 ± 39	36.2 ± 3.7	102.9 ± 16

Los valores corresponden a la media de dos experimentos independientes ± desvío estándar

La Fig. 2.7 ilustra el contenido de glucosamina y la actividad volumétrica a las 135 horas, en cultivos llevados a cabo a los siguientes valores de pHi: 5.40, 2.60, 2.20, 2.00 y 1.80. Como puede observarse, el contenido medio de glucosamina de los cultivos decae conforme el pHi disminuye, pero sin embargo, la actividad PGasa presenta un pico a pHi 2.60 y disminuye hacia valores mayores o menores, tal como se indicó más arriba. Estos resultados refutan la hipótesis planteada anteriormente ya que el desarrollo de *A. sojae* en cultivos a pHi 2.60, los cuales presentan un mayor contenido de azúcares solubles al comienzo de los mismos, es igual o menor que a valores de pHi de 5.40.

Al examinar al microscopio el caldo de cultivos a distintos valores de pHi se encontró que cuando *A. sojae* se cultivó a valores de pHi de 5.40, éste desarrolló en forma de aglomerados densos y cuasi esféricos de hifas (pellets), mientras que

para el caso de los cultivos llevados a cabo a valores de pHi cercanos a 2.60 (2.40, 2.60, 2.80) se observó mayoritariamente micelio más bien disperso (Fig. 2.8).

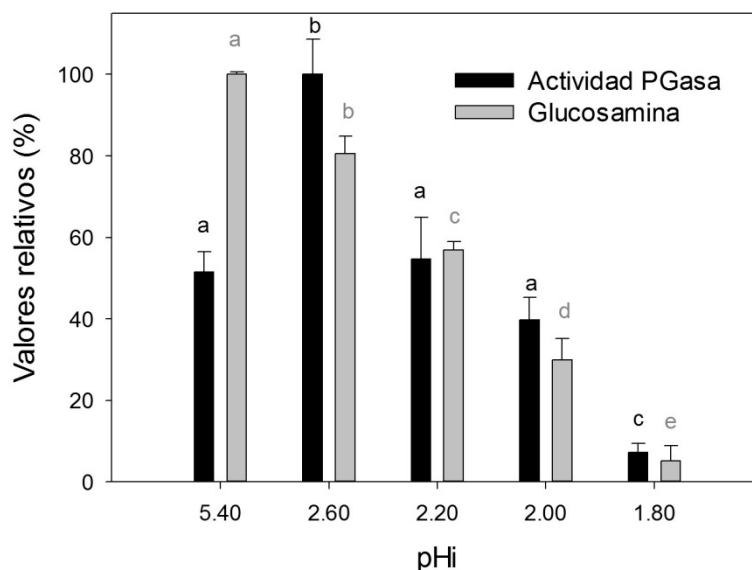


Figura 2.7. Contenido de glucosamina y actividad PGasa a las 135 horas de cultivo. Valores expresados en porcentaje respecto al valor más elevado. Las barras de error representan el desvío estándar calculado con dos experimentos. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a test LSD ($p < 0.05$).

Estas diferencias morfológicas observadas en los cultivos realizados con cáscaras de soja a distinta acidez inicial llevaron a la decisión de realizar cultivos control a las mismas condiciones de pHi pero reemplazando las cáscaras de soja por glucosa, con el fin de estudiar si la naturaleza particulada del medio de cultivo ejercía alguna influencia en la morfología predominante. Independientemente del valor de pHi al que se realizaron los cultivos con glucosa, el resultado fue el crecimiento en forma de pellets. El valor medio del diámetro de los pellets desarrollados con cáscaras de soja a pHi 5.40 ($341 \pm 155 \mu\text{m}$) fue dos veces más pequeño si se lo compara con el de los pellets obtenidos con glucosa a pHi 2.60 ($670 \pm 131 \mu\text{m}$). En cuanto a los pellets de *A. sojæ* encontrados en el medio de cultivo con glucosa a pHi 5.40, estos fueron los de mayor tamaño, llegando a medir hasta 5 mm de diámetro (Fig. 2.9). Dados estos resultados, es posible que en los cultivos a pH ácido la producción enzimática haya sido más eficiente, en parte, debido a morfología de hifas dispersas en la que desarrolló *A. sojæ*, la cual garantizaría un contacto adecuado entre los nutrientes y la biomasa

a la vez que previene que ocurran limitaciones en procesos de difusión asociados a la morfología de pellets [Hille et al., 2005].

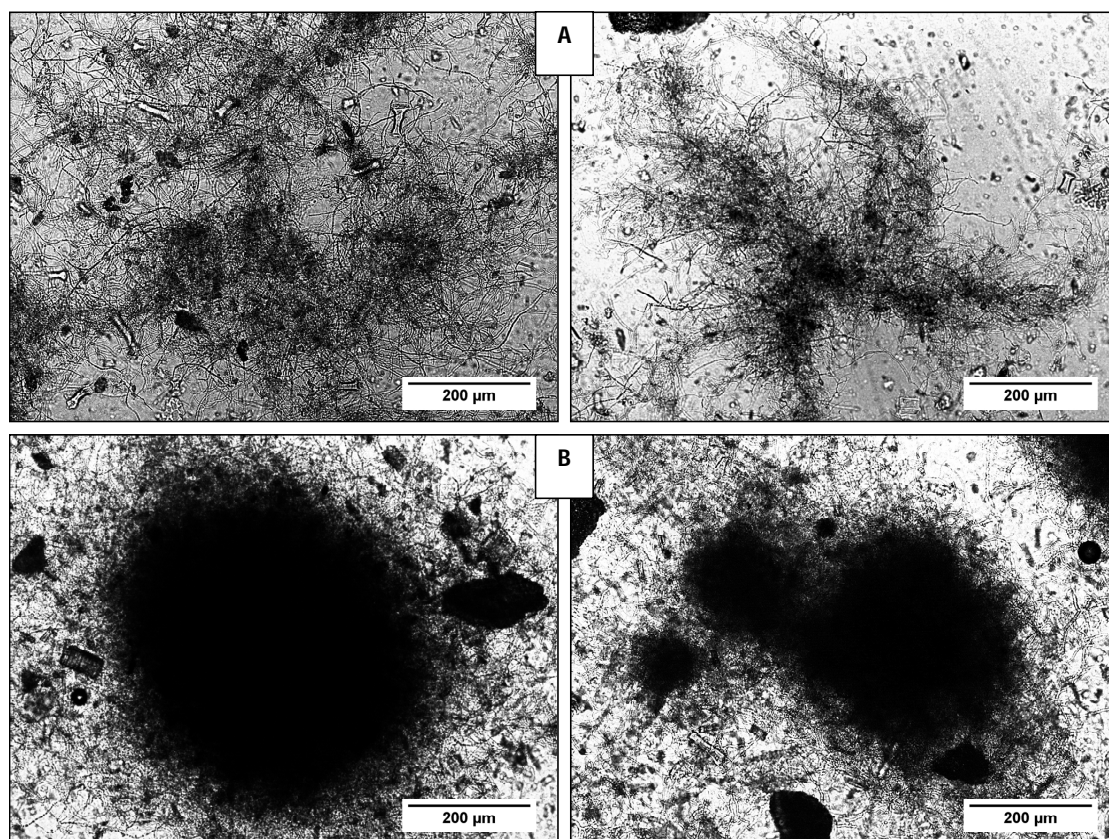


Figura 2.8. Desarrollo morfológico de *A. sojae*, 72 horas después de la inoculación, en cultivos sumergidos con cáscaras de soja como única fuente de carbono llevados a cabo a distintos valores de pH inicial. (A) Morfología dispersa típica encontrada a pH 2.60. (B). Morfología de pellets típica encontrada a pH 5.40.

A pesar de las dificultades que existen para establecer relaciones generales entre la morfología fúngica y variables de proceso, se ha llegado al consenso de que la formación de pellets se ve favorecida conforme el pH ambiental aumenta [Papagianni, 2004]. Entre los diferentes mecanismos por los cuales ocurre la formación de pellets en los hongos filamentosos, el de tipo coagulante, predominante en especies del género *Aspergillus*, implica la agregación de conidios, primeramente entre sí en la etapa inicial del cultivo y luego por la adhesión de conidios a la estructura tubular de las hifas en desarrollo [Carlsen et al., 1996; Nielsen, 1996; Grimm et al. 2004]. La formación de pellets se atribuye, entre otros fenómenos, a interacciones electrostáticas [Zhang & Zhang, 2015], por

lo que a un pH ambiental bajo los conidios llevarían una carga positiva lo suficientemente alta como para desfavorecer, por repulsión electrostática, la agregación entre conidios y así limitar la formación de pellets [Dynesen & Nielsen, 2003; Papagianni, 2004]. Adicionalmente, es probable que las partículas de las cáscaras de soja empleadas en este estudio hayan contribuido a restringir la formación de pellets actuando como obstáculos a los choques o encuentros aleatorios entre conidios, lo cual es el mismo principio en el que se basan técnicas modernas de bioingeniería como el agregado de micropartículas inertes al medio de cultivo [Kaup et al., 2008; Driouch et al., 2010]. Esta presunción se afianza al observar la diferencia de tamaño entre los pellets provenientes de cultivos a valores de pHi de 5.40 con cáscaras de soja y con glucosa (Fig. 2.8 B y 2.9 B).

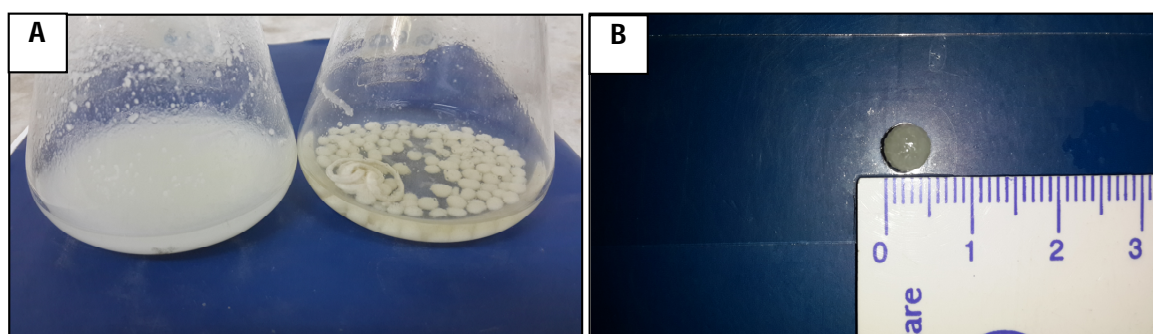


Figura 2.9. Desarrollo morfológico de *A. sojae* con glucosa como fuente de carbono luego de 72 horas de realizada la inoculación. (A) Cultivos en erlenmeyer realizados a valores de pHi de 2.60 (izquierda) y 5.40 (derecha). (B) Tamaño de pellet típico al cual desarrolló *A. sojae* a pHi 5.40.

Por otro lado, existen varios estudios que apuntan a que la expresión y secreción de pectinasas en ascomicetos se encuentra modulada por el pH ambiental. Rollins & Dickman [2001] encontraron que el número de transcritos del gen que codifica para una endo-poligalacturonasa (*pg1*) de *Sclerotinia sclerotiorum* alcanzó niveles máximos a pH 3.0 – 3.8 y disminuyó significativamente a pH 4.2; mutantes de este hongo en el locus *pac1* que codifica para un factor de transcripción modulado por pH exhibieron un desplazamiento en el pico de acumulación de los transcritos del gen *pg1* hacia valores más altos de pH [Rollins, 2003]. Descrito por primera vez en *A. nidulans* [Peñalva et al. 2008], el sistema de regulación de la expresión génica en respuesta al pH ambiental mediado por el factor de transcripción PacC se ha encontrado también en otros miembros del mismo género [Prusky & Yacobi, 2003], pero en lo que

respecta a pectinasas, si bien se han descrito sitios de reconocimiento putativos para proteínas homólogas a PacC en promotores de genes pectolíticos de *A. niger* [de Vries et al., 2002], al día de la fecha no se han realizado o publicado estudios de funcionalidad. En cuanto a regulación post-traducciona, Teixeira et al. [2014] reportaron diferentes niveles de secreción de PGasa en cepas recombinantes de *A. griseoroseum* cultivados en diferentes condiciones de pH, sin haber encontrado cambios en los niveles del transcripto en cuestión.

En conjunto, los resultados presentados en esta sección sugieren que la mejora en la producción de actividad PGasa bajo condiciones ácidas es una consecuencia del efecto combinado de la morfología en hifas dispersas predominante y de una expresión génica más elevada y/o una secreción proteica más eficiente. Sin embargo, apuntando a la posible causa de la producción mejorada de PGasa abarcando específicamente la pequeña ventana de pH ácido (2.80 – 2.20), puede descartarse que la causa sea por cambios morfológicos ya que entre las muestras de cultivo tomadas a pH 2.80, 2.60 o 2.40 no se hallaron diferencias al microscopio, por lo que la explicación más plausible sería una modulación fina de la producción de PGasa a nivel de transcripto o de proteína. Dado que las condiciones de pH en las que se encontró la mejora productiva son considerablemente ácidas y severas para el microorganismo, la razón biológica de una mayor producción de PGasa bajo estas condiciones ambientales podría ser una respuesta al estrés dirigida a asegurar una adquisición apropiada de nutrientes para hacer frente a condiciones ambientales no favorables. En este marco, el estudio de la regulación transcripcional de genes pectolíticos y de los componentes del sistema PacC/Pal bajo condiciones de pH similares a las cubiertas en este trabajo serían temas interesantes para investigaciones futuras.

Desde el punto de vista del bioproceso, algunos estudios previos sobre la producción de PGasa por *A. sojae* en cultivos sumergidos empleando cáscaras de naranja han demostrado que es mejor llevar a cabo el proceso bajo condiciones de pH no controladas por sobre cualquier otra condición de pH controlada (p. ej. pH 3, pH 4, pH 5, pH 6) para obtener títulos elevados [Gogus et al., 2014; Buyukkileci et al., 2011]. Sin embargo, los hallazgos del presente estudio demuestran la importancia del ajuste fino de las condiciones de cultivo, en este caso del pH, para mejorar la producción enzimática.

Cultivos en biorreactor de tanque agitado empleando cáscaras de soja

El medio de cultivo optimizado y ajustado a pH 2.60 se empleó para crecer a *A. sojae* en biorreactores de tipo tanque agitado, a fin de verificar si los rendimientos en actividad PGasa son reproducibles en las condiciones ambientales de un fermentador. Se realizó una réplica del cultivo, obteniéndose resultados similares.

El curso temporal de la producción enzimática, el consumo de azúcares solubles y la tensión de oxígeno disuelto (TOD) pueden observarse en la Fig. 2.10 A, mientras que la Fig. 2.10 B muestra el perfil de las presiones parciales de oxígeno y de dióxido de carbono a la salida del biorreactor. La TOD disminuyó en forma exponencial desde aproximadamente las 18 horas hasta las 26.5 horas de cultivo, momento en el cual se evidenció un incremento en forma de escalón desde un 21 % a un 60 % que, a su vez, coincidió con un descenso abrupto en la presión parcial de dióxido de carbono de salida. Desde ese momento en adelante, la TOD aumentó paulatinamente hasta el final del cultivo. El comportamiento en espejo de las presiones parciales de salida de oxígeno y dióxido de carbono es una clara señal de un metabolismo completamente respiratorio [Cavalitto et al., 2000], lo cual es algo usual en hongos filamentosos. Los azúcares totales solubles disminuyeron desde 7.5 g/L hasta alrededor de 4 g/L durante las primeras 24 horas, mientras que la concentración de azúcares reductores cayó a un valor mínimo a las 192 horas de cultivo, pero entre las 27 y 44 horas se incrementó notablemente para posteriormente retomar la tendencia esperada de consumo. La caída exponencial en la TOD durante las primeras 24 horas es consistente con una elevada tasa de consumo de los azúcares solubles presentes en el medio de cultivo. Los monosacáridos presentes en los hidrolizados de cáscaras de soja suelen en su mayoría comprender xilosa, manosa y arabinosa, los dos primeros debido a la degradación de hemicelulosa mientras que las moléculas de arabinosa provienen de la pectina; los azúcares estructurales restantes de la pectina de las cáscaras de soja aparentemente no son hidrolizados durante un ciclo de esterilización en autoclave [Schirmer-Michel et al., 2008]. Dichos azúcares podrían ejercer cierto efecto inhibitorio sobre la producción de actividad PGasa, no así la glucosa ya que la misma no se detectó en ningún momento a lo largo del cultivo.

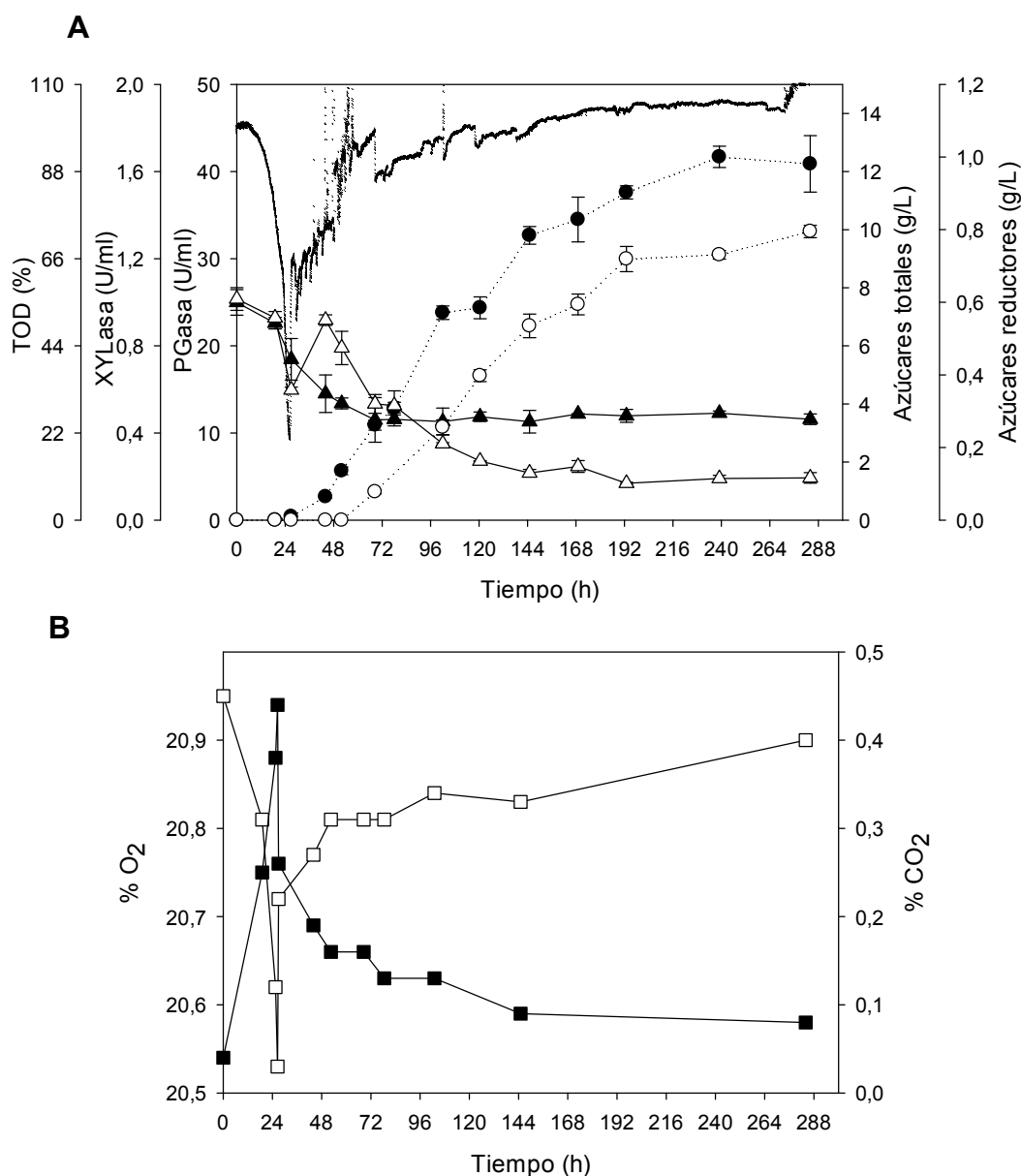


Figura 2.10. Perfil de cultivo de *A. sojae* creciendo en medio de cultivo con 30 g/L de cáscaras de soja como fuente única de carbono, en un biorreactor de tanque agitado de 2.5 L de capacidad operado a 450 rpm y 0.6 vvm. (A): actividad PGasa (●), actividad XYLasa (○), TOD (-), azúcares totales (▲), azúcares reductores (△). (B): presiones parciales de oxígeno (□) y de dióxido de carbono (■) a la salida del biorreactor. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones y las barras de error representan el desvío estándar de los valores medios.

El cambio abrupto en la presión parcial de dióxido de carbono a las 26.5 horas indica una actividad metabólica más baja posiblemente relacionada con la escasez de azúcares fácilmente disponibles, que coincide con el momento en el

cual comienza a detectarse actividad PGasa y por tanto sugiere un cambio en el tipo de fuente de carbono utilizada por *A. sojae* hacia las partículas de cáscaras de soja suspendidas; esta suposición se apoya en el incremento en los azúcares reductores evidenciado entre las 27 y las 44 horas de cultivo. El punto de inflexión en la TOD es consistente con la explicación anterior y ha sido reportado previamente en cultivos sumergidos de *A. sojae* creciendo a partir de otros subproductos tales como cáscaras de naranja [Buyukkileci et al., 2015].

En cuanto a la actividad PGasa, ésta alcanzó un máximo de 42 U/ml a las 240 horas de cultivo, y cabe destacar que los valores medidos a las 110 horas (23 U/ml a las 102 horas y 25 U/ml a las 120 horas) fueron muy similares a los obtenidos en matraces Erlenmeyer, lo cual indica una buena adecuación del bioproceso a biorreactores de tanque agitado. Al analizar el curso de producción de PGasa con cáscaras de soja desde el momento en que comienza a evidenciarse actividad enzimática, se distingue una primera fase entre las 24 a 144 horas, seguida de una segunda fase de 144 horas en adelante cuya tasa de producción es comparativamente menor. La productividad global, calculada a las 240 hs por ser el momento en el que se alcanzan los niveles más altos de actividad PGasa, fue de 0.174 U/ml.h; vale la pena mencionar que los valores de productividad son un 30 % más elevados si el cálculo se realiza a las 144 horas (0.225 U/ml.h), por lo que es un factor que debería tenerse en cuenta para decidir la duración del cultivo con fines de producción.

Li et al. [2017] sometieron a prueba a un total de 15 especies y cepas diferentes de *Aspergillus* como productores de carbohidrasas empleando cáscaras de soja y destacaron una cepa de *A. niger* como el de mejor desempeño, produciendo 15.6 U/ml en 72 horas. Dado que en este último caso la determinación de actividad se realizó en condiciones más favorables para la catálisis enzimática (50° C contra 35° C en el presente estudio), los resultados obtenidos con *A. sojae* (11 U/ml en 68 horas) muestran el potencial de esta cepa como productora de PGasas a partir de cáscaras de soja. El rendimiento final en actividad PGasa calculado por gramo de cáscaras fue de 1.39 U/g, un valor comparativamente más elevado que las 0.58 U/g obtenidas a partir de cultivos sumergidos de *Trichoderma reesei* con el mismo sustrato como principal fuente de carbono [Coffman et al., 2014].

En lo que respecta a otras carbohidrasas, no se detectó actividad endoglucanasa, lo cual es consistente con la ausencia de glucosa a lo largo del cultivo. Por otro lado, los sobrenadantes del cultivo resultaron positivos para actividad

XYLasa a partir de las 48 horas de iniciado el mismo (Fig. 2.10 A) y se generó un máximo de 1.3 U/ml después de 288 horas, lo cual es significativamente menor comparado con los niveles de actividad PGasa y con otros reportes encontrados en literatura [Coffman et al., 2014; Li et al., 2017], pero que evidencia la capacidad de este sustrato de inducir la producción de enzimas xilanolíticas en *A. sojae*.

Teniendo en cuenta que la productividad en relación a la actividad PGasa fue similar tanto en matraces Erlenmeyer como en biorreactores de tanque agitado, se decidió realizar un cultivo adicional en el cual se duplicó la concentración de medio de cultivo (es decir, 60 g/L cáscaras de soja, 14 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) procurando que la productividad del proceso se duplicase. El perfil completo del cultivo se muestra en la Fig. 2.11.

El pH del cultivo siguió un perfil similar al representado en la Fig. 2.2 B, observándose una caída durante las primeras 48 horas, relacionada a la actividad metabólica del microorganismo durante su fase de crecimiento. La evolución de los azúcares totales y reductores es idéntica a la observada en los cultivos con 30 g/L de cáscaras de soja; el nivel residual de los azúcares finalizado el cultivo es el doble del observado en el lote de cultivos anteriores, lo cual por otra parte es lo esperable de haber duplicado la concentración del medio y apunta a que una importante proporción de los azúcares solubles provenientes de las cáscaras de soja no es metabolizada por el microorganismo. Incrementando al doble la concentración del medio de cultivo, el comportamiento del oxígeno disuelto cambió sustancialmente: alrededor de las 24 horas la TOD cayó por debajo del 20 %, activando el control en cascada con la velocidad de agitación, la cual pasadas las 72 horas llegó al valor máximo fijado (800 rpm) mientras que la TOD, mantenida desde las 24 horas al 15 % a expensas de la agitación mecánica, disminuyó gradualmente hasta llegar a 0 % cercanas 144 horas de cultivo. Cabe la posibilidad de que a partir de las 144 horas la membrana del electrodo de oxígeno se obstruyese con partículas del medio de cultivo o debido a la adhesión del microorganismo en desarrollo, por lo que las medidas de la TOD no son del todo fidedignas. Aún así, dado que la actividad PGasa obtenida a las 240 horas fue de 61 U/ml – un 50 % del valor esperado – es probable que cultivo se encontrase limitado en oxígeno durante el primer tercio del mismo.

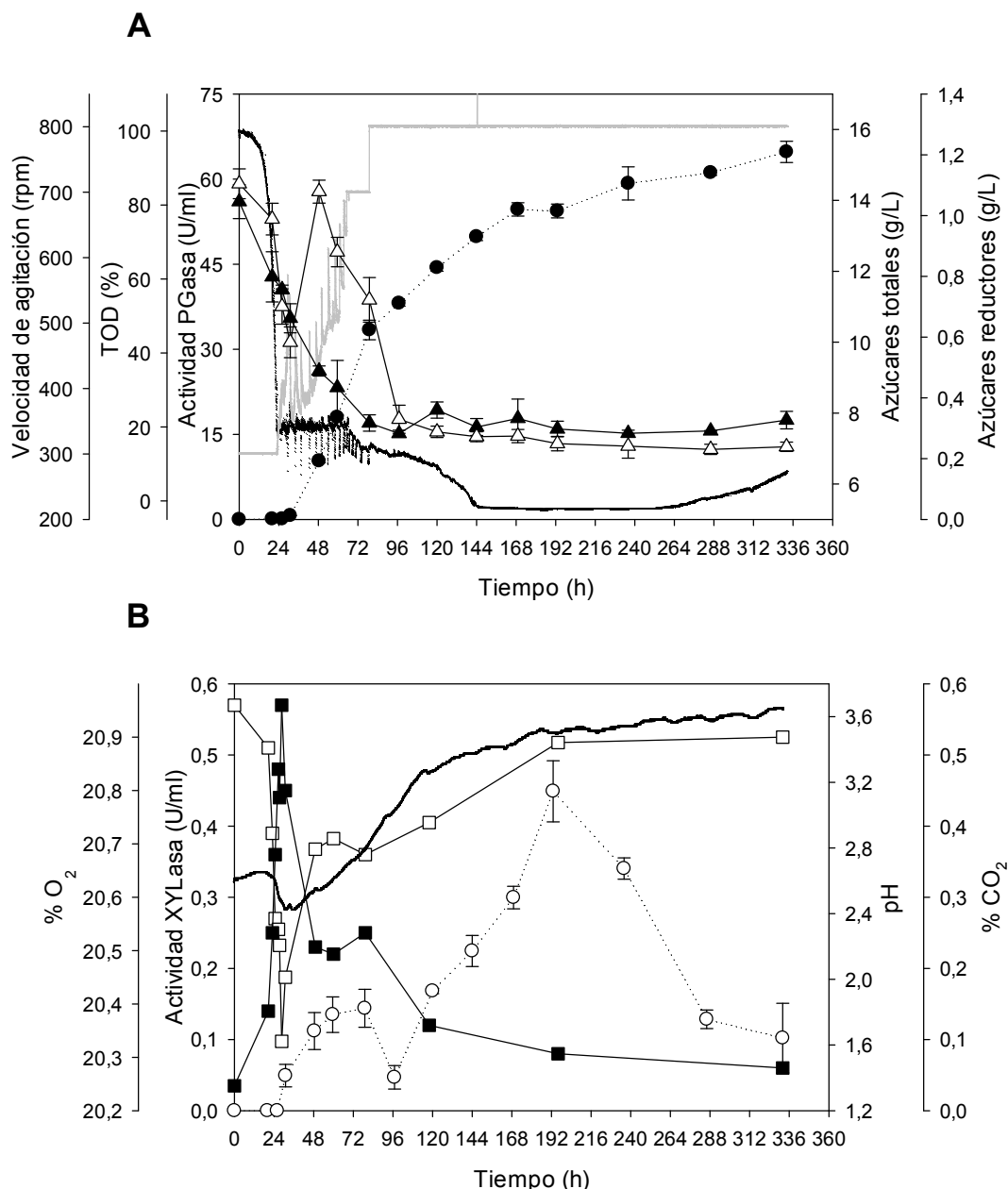


Figura 2.11. Perfil de cultivo de *A. sojae* creciendo en medio de cultivo con 60 g/L de cáscaras de soja como fuente única de carbono, en un biorreactor de tanque agitado de 2.5 L de capacidad. (A): actividad PGasa (●), velocidad de agitación (-, línea gris), TOD (-, línea negra), azúcares totales (▲), azúcares reductores (△). (B): actividad XYLasa (○), pH (-), presiones parciales de oxígeno (□) y de dióxido de carbono (■) a la salida del biorreactor. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones y las barras de error representan el desvío estándar de los valores medios.

En fermentaciones con hongos filamentosos la limitación por oxígeno es un aspecto importante a tener en cuenta ya que los caldos de cultivo resultan

altamente viscosos debido a la naturaleza de estos microorganismos, lo cual se traduce en un coeficiente de transferencia de masa líquido-gas (K_{La}) mucho menor en comparación con fermentaciones llevadas a cabo con microorganismos unicelulares [Cui et al., 1998]. En este sentido, una concentración 60 g/L de cáscaras de soja contribuyó a incrementar la viscosidad del caldo, hecho que fue reportado previamente en cultivos similares de *A. sojae* con cáscaras de naranja [Buyukkileci et al., 2015]. Respecto a la actividad XYLasa, los valores máximos obtenidos en este cultivo fueron 3 veces menores respecto al lote anterior, observándose una caída en la actividad a partir de las 192 horas y un pequeño valle a las 96 horas, sugiriendo estos resultados una conexión con la evolución de la TOD.

Estudios de producción de PGasa con cáscaras de naranja y pomaza de durazno y damasco

Para los ensayos discutidos a continuación se utilizó una cepa mutante de *A. sojae*, seleccionada por Heerd et al. [2014] en base a su elevado nivel de actividad PGasa producido respecto de la cepa parental. Se realizaron individualmente tres diseños Doehlert con nueve experimentos cada uno, con el fin de maximizar la producción de PGasa con cáscaras de naranja, pomaza de durazno y pomaza de damasco. La Tabla 2.14 muestra las cantidades de los subproductos (expresada en concentración de azúcares totales solubles) y de $(NH_4)_2SO_4$ utilizadas para los diseños experimentales, así como la actividad PGasa cuantificada 144 horas después de inoculados los cultivos.

A partir de los ANOVA de la Tabla 2.15 se ve que para cada uno de los diseños se seleccionó un modelo cuadrático completo; en otras palabras, los mejores modelos para describir el comportamiento de las respuestas fueron aquellos que tienen en cuenta todos los efectos de primer y segundo orden, tal como se deduce de los valores p. En los tres casos los valores de R^2 fueron mayores que 0.98, por lo que, como mucho, sólo el 2 % de la actividad PGasa no es predicha por los modelos. Por otro lado, a juzgar por el valor p de la falta de ajuste, los modelos así ajustados describen adecuadamente los datos experimentales obtenidos.

Tabla 2.14. Diseño de Doehlert y actividad PGasa determinada a las 144 horas, correspondiente a los cultivos con cáscaras de naranja, pomaza de durazno y pomaza de damasco.

N ^o _a	Azúcares totales solubles (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Actividad PGasa (U/ml)		
			Cáscaras de naranja	Pomaza de durazno	Pomaza de damasco
1	20.0 (1) ^b	2.50 (0)	55.8	34.0	40.3
2	16.0 (0.5)	0.33 (0.867)	0	50.6	48.6
3	8.0 (-0.5)	0.33 (0.867)	0	9.34	18.1
4	4.0 (-1)	2.50 (0)	10.8	4.67	9.78
5	8.0 (-0.5)	4.67 (-0.867)	26.8	0.15	2.08
6	16.0 (0.5)	4.67 (-0.867)	56.3	1.08	2.52
7	12.0 (0)	2.50 (0)	48.3	40.3	53.1
8	12.0 (0)	2.50 (0)	50.2	34.6	55.4
9	12.0 (0)	2.50 (0)	43.5	43.3	54.6

^a: número de experimento; ^b: factores codificados

Tabla 2.15 A. ANOVA del modelo seleccionado a partir de los resultados de los diseños de Doehlert empleando cáscaras de naranja

Parámetro	SC	GL	CM	Estadístico F	Valor p
AST	1190.0	1	1190.0	99.81	0.0099
(NH ₄) ₂ SO ₄	1726.4	1	1726.4	144.79	0.0068
AST.AST	236.3	1	236.3	19.82	0.0469
AST. (NH ₄) ₂ SO ₄	217.6	1	217.6	18.25	0.0507
(NH ₄) ₂ SO ₄ . (NH ₄) ₂ SO ₄	1133.4	1	1133.4	95.06	0.0104
Falta de ajuste	40.0	1	40.0	3.36	0.2083
Error puro	23.8	2	11.9		
Total	4409.1	8			
R ² = 0.9855		R ² _{aj} = 0.9613			

AST: azúcares totales solubles, SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: suma de cuadrados media

Tabla 2.15 B. ANOVA del modelo seleccionado a partir de los resultados de los diseños de Doehlert empleando pomaza de durazno

Parámetro	SC	GL	CM	Estadístico F	Valor p
AST	847.5	1	847.5	43.40	0.0223
(NH ₄) ₂ SO ₄	861.7	1	861.7	44.12	0.0219
AST.AST	483.1	1	483.1	24.74	0.0381
AST. (NH ₄) ₂ SO ₄	406.6	1	406.6	20.82	0.0448
(NH ₄) ₂ SO ₄ . (NH ₄) ₂ SO ₄	777.5	1	777.5	39.81	0.0242
Falta de ajuste	27.5	1	27.5	1.41	0.3568
Error puro	39.1	2	19.5		
Total	3240.3	8			
R ² = 0.9794		R ² _{aj} = 0.9452			

AST: azúcares totales solubles, SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: suma de cuadrados media

Tabla 2.15 C. ANOVA del modelo seleccionado a partir de los resultados de los diseños de Doehlert empleando pomaza de damasco

Parámetro	SC	GL	CM	Estadístico F	Valor p
AST	705.0	1	705.0	517.13	0.0018
(NH ₄) ₂ SO ₄	964.1	1	964.1	707.17	0.0013
AST.AST	1032.1	1	1032.1	757.02	0.0013
AST. (NH ₄) ₂ SO ₄	225.9	1	225.9	165.70	0.0057
(NH ₄) ₂ SO ₄ . (NH ₄) ₂ SO ₄	1820.2	1	1820.2	1335.12	0.0007
Falta de ajuste	0.03	1	0.03	0.02	0.9143
Error puro	2.73	2	1.36		
Total	4297.8	8			
R ² = 0.9994		R ² _{aj} = 0.9983			

AST: azúcares totales solubles, SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: suma de cuadrados media

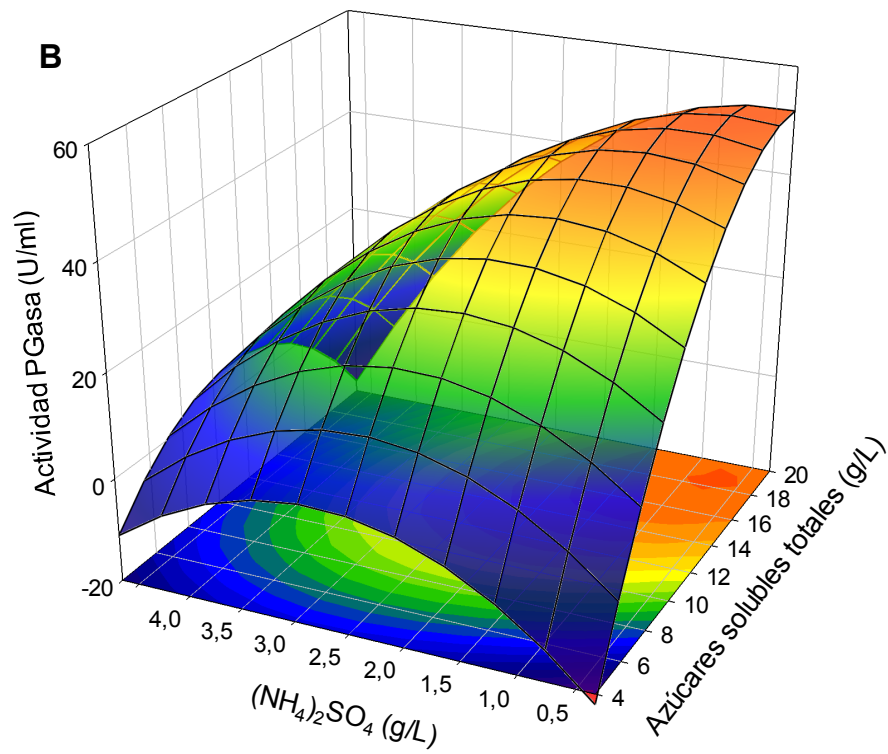
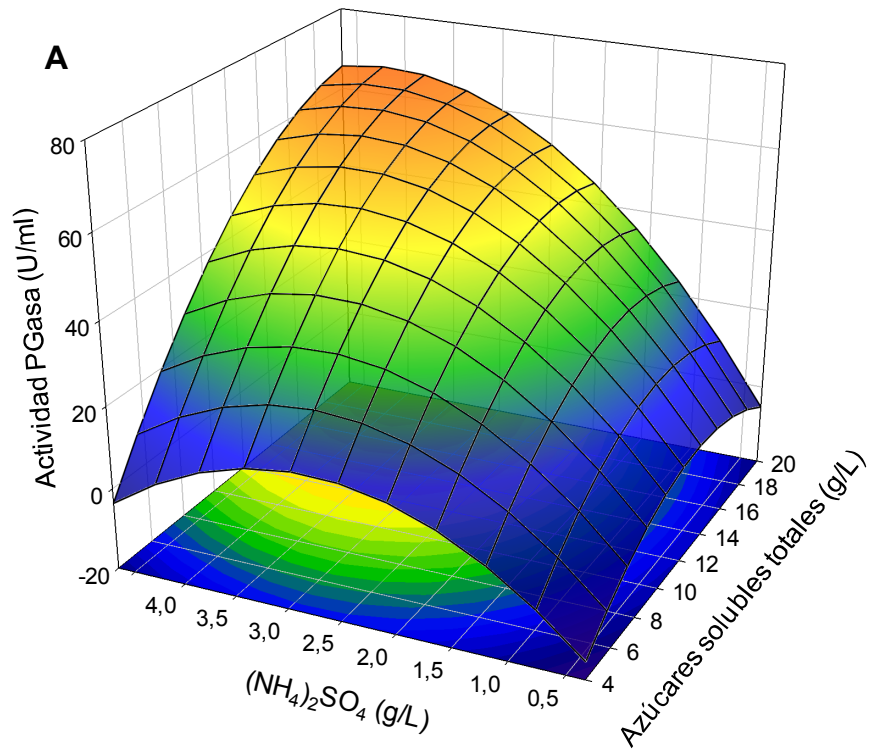
El listado con los términos de los polinomios con los que se construyeron las superficies de respuesta que describen la actividad PGasa con cada uno de los subproductos se exhibe en la Tabla 2.16.

Tabla 2.16. Coeficientes de los polinomios que describen la producción de PGasa según los resultados de los diseños de Doehlert con cáscaras de naranja, pomaza de durazno y pomaza de damasco.

Términos de la ecuación	Cáscaras de naranja		Pomaza de durazno		Pomaza de damasco	
	C. codif.	C. real	C. codif.	C. real	C. codif.	C. real
Constante	47.33	-43.29	39.40	-74.39	54.41	-81.67
AST	19.92	5.62	16.81	12.54	15.32	15.08
(NH ₄) ₂ SO ₄	23.96	23.96	-16.93	27.55	-17.91	34.40
AST.AST	-14.13	-0.22	-20.06	-0.31	-29.38	-0.46
AST. (NH ₄) ₂ SO ₄	17.01	0.85	-23.26	-1.16	-17.29	-0.87
(NH ₄) ₂ SO ₄ . (NH ₄) ₂ SO ₄	-30.63	-4.92	-25.46	-4.07	-38.89	-6.23

C. codif: coeficientes en valor codificado, C. real: coeficientes en valor real

De acuerdo a las superficies de respuesta, pueden obtenerse valores elevados de actividad PGasa cuanto mayor sea la concentración de azúcares totales solubles en todos los casos (Fig. 2.12), lo cual resulta razonable. La gráfica correspondiente a los cultivos con pomaza de damasco muestra un máximo de actividad a aproximadamente 17 g/L de azúcares totales solubles y 1.5 g/L de (NH₄)₂SO₄ (Fig. 2.12 C). En cuanto a los cultivos con pomaza de durazno, el comportamiento de la respuesta exhibido en la Fig. 2.12 B es similar al observado en su par con pomaza de damascos, si bien el máximo se encuentra más desplazado hacia el extremo de la superficie de respuesta definido por los valores más bajos y más elevados de (NH₄)₂SO₄ y de azúcares totales solubles, respectivamente, del espectro de concentraciones ensayadas. Curiosamente, los valores más elevados de actividad PGasa para los cultivos con las pomazas resultantes de estos frutos de carozo se obtuvieron a valores de (NH₄)₂SO₄ más bien bajos. Por otra parte, la superficie de respuesta obtenida en base a los resultados de los cultivos con cáscaras de naranja muestran un comportamiento más acorde con el observado con cáscaras de soja, esto es, un incremento en la actividad PGasa hacia valores más elevados que 5 g/L (comparar Fig. 2.3 y Fig. 2.12 A). Los resultados con cáscaras de naranja son consistentes con los obtenidos en Gogus et al. [2015], en donde se encontró una correlación positiva entre el incremento de la concentración de (NH₄)₂SO₄ y el de la actividad PGasa producida por *A. sojae*.



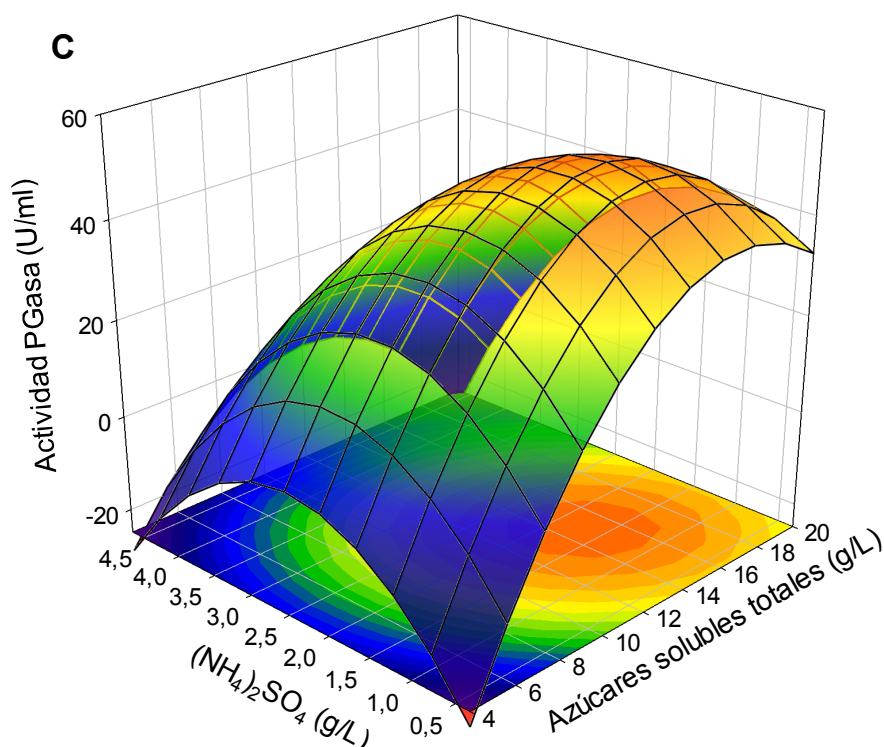


Figura 2.12. Superficies de respuesta obtenidas a partir de los diseños de Doehlert, correspondientes a los cultivos con cáscaras de naranja (A), pomaza de durazno (B) y pomaza de damasco (C). Cada gráfico muestra el efecto de la concentración de los subproductos y del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en la producción de actividad PGasa.

Este comportamiento diferencial de la actividad PGasa y la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre cultivos con cáscaras de naranja y cultivos con pomazas de durazno y damasco podría estar relacionado con el contenido de nitrógeno de los distintos residuos empleados. Desafortunadamente, la información del contenido de nitrógeno de estos subproductos existente en literatura varía considerablemente [Pagan et al., 2001; Martín et al., 2010; Ucuncu et al., 2013]. De hecho, la composición de cada subproducto puede modificarse por varios factores tales como la variedad del fruto, la condición estacional del cultivo y el tratamiento previo aplicado hasta llegar al residuo [Paganini et al., 2005, Al Loman & Ju, 2016].

Cultivos en biorreactor de tanque agitado empleando cáscaras de naranja y pomaza de damasco

De acuerdo con los resultados anteriores, ya que los tres subproductos resultaron adecuados para la producción de PGasa con valores entre 50 y 60

U/ml, se decidió realizar una serie de cultivos en biorreactor de tanque agitado empleando una mezcla de cáscaras de naranja y pomaza de damasco. La elección de la pomaza de damasco por sobre la de durazno fue únicamente por cuestiones de disponibilidad al momento de la realización de los ensayos. En cuanto a las concentraciones de cáscaras de naranja y pomaza de damasco utilizadas, éstas fueron elegidas en base a estudios previos con cáscaras de naranja y otras pomazas, particularmente pomaza de manzanas, como fuente de carbono; trabajando con estos residuos, Gogus et al. [2015] encontraron que un total de 21 g/L de azúcares totales solubles provenientes de cáscaras de naranja y pomaza de manzanas en una relación 3:1 resultaba la mejor combinación en cuanto a producción de actividad PGasa con *A. sojae*. En definitiva, se utilizó cáscara de naranja (14 g/L de azúcares totales solubles) y pomaza de damasco (7 g/L de azúcares totales solubles); la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ empleada en estos cultivos fue de 11.5 g/L.

Tal como se discutió para el caso de los cultivos con cáscaras de soja, los caldos de cultivo altamente viscosos que resultan del cultivo de hongos filamentosos con subproductos de origen vegetal puede acarrear problemas de transferencia de oxígeno, tornándose este nutriente un factor limitante para el crecimiento microbiano y la producción de enzimas. Considerando este aspecto, se realizaron fermentaciones en tres condiciones operacionales distintas, definidas por la configuración de la velocidad de agitación y la aireación (Tabla 2.17).

Tabla 2.17. Condiciones operacionales ensayadas en los cultivos en biorreactor de tanque agitado con una mezcla de cáscaras de naranja y pomaza de damasco

Cultivo	Velocidad de agitación	Aireación	Condiciones iniciales
1	600 rpm	1 vvm	Constante
2	En cascada	1 vvm	300 rpm / 1 vvm
3	600 rpm	En cascada	600 rpm / 0.1 vvm

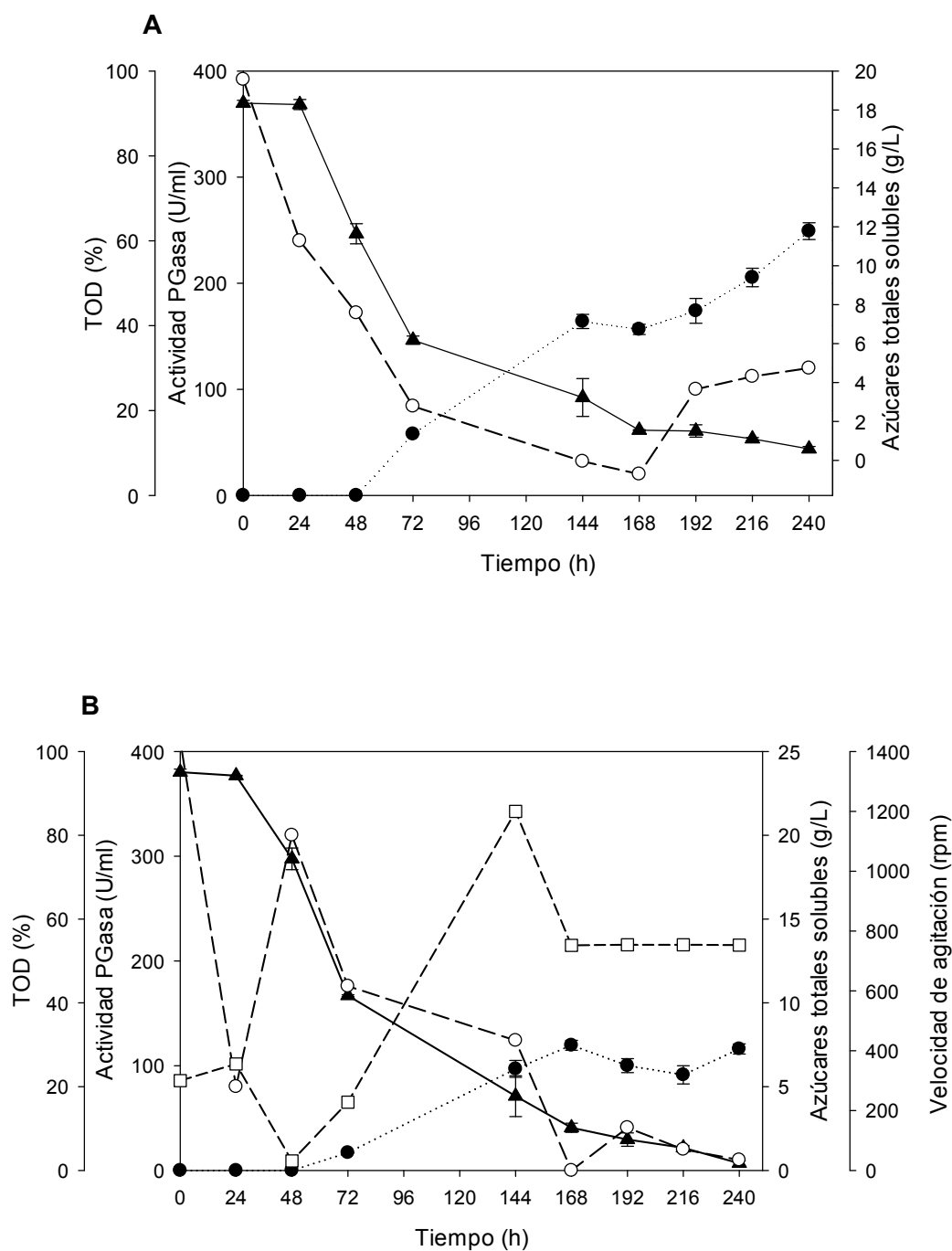
Los valores de actividad PGasa, azúcares totales solubles, TOD y velocidad de agitación y aireación – de corresponder – como función del curso temporal de las fermentaciones se muestran en la Fig. 2.13. Los azúcares solubles decrecieron hasta llegar a 2 g/L entre las 144 y 168 horas de cultivo en los tres casos, lo cual indica una utilización eficiente de la fuente de carbono soluble por parte del microorganismo.

El primer biorreactor se operó a flujo de aire y velocidad de agitación constantes (1 vvm y 600 rpm), y rindió 250 U/ml al final del período de cultivo (Fig. 2.13 A). Durante las primeras 24 horas de cultivo el medio se mantuvo como inicialmente, pudiendo apreciarse como una solución acuosa con partículas suspendidas. Pasado ese tiempo el incremento de biomasa y la posible degradación del tejido vegetal, con la concomitante liberación de pectina, habrían tornado el medio de cultivo en un caldo viscoso, disminuyendo la TOD considerablemente. Luego de 168 horas la TOD incrementó nuevamente, lo cual se explicaría por una reducción gradual de la viscosidad del medio conforme el cultivo llega a su fin. En conjunto, aunque se obtuvieron valores considerablemente elevados de actividad PGasa – más aún si se compara con los rendimientos con la cepa salvaje – puede verse que la TOD cayó por abajo del 20 % luego de 72 horas y se mantuvo por debajo de este valor durante la fase intermedia del cultivo. Este comportamiento probablemente esté relacionado con el K_{La} por ser este parámetro inversamente proporcional a la viscosidad [Bandaiphet & Prasertsan, 2006]. Dado que el K_{La} puede modificarse al incrementar la velocidad de agitación o el flujo de aire, se estudiaron los efectos de estas dos variables de proceso en dos cultivos individuales.

Puede verse que cuando la aireación se mantuvo en un valor constante de 1 vvm y la TOD se controló mediante la velocidad de agitación, esta última alcanzó 1200 rpm pasadas 100 horas (Fig. 2.13 B). En consecuencia, dado el posible efecto perjudicial del esfuerzo de corte que el agitador girando a tales valores pudiere generar tanto al micelio como a la estructura nativa de las proteínas, la configuración en cascada se desactivó y la velocidad de agitación se fijó en 750 rpm, lo cual conllevó a una disminución en la TOD hasta valores cercanos a 0 %. Respecto a la condición anterior los niveles de actividad alcanzados fueron casi la mitad, por lo que la causa sería una combinación los efectos del alto esfuerzo de corte causado por el agitador y limitación por oxígeno. Este comportamiento se reportó previamente en cultivos con *A. niger* destinados a la producción de proteínas recombinantes en biorreactores de tanque agitado [Wang et al., 2003; Kelly et al., 2004], en donde incrementos en la velocidad de agitación condujeron a aumentos a la par en la actividad enzimática hasta llegar a un valor límite a partir del cual el esfuerzo de corte generó daños a las hifas, resultando en un desarrollo limitado de biomasa y consecuentemente también de producto.

Bandaiphet & Prasertsan [2006] reportaron que una alternativa a incrementar la velocidad de agitación para mejorar el K_{La} es aumentar el flujo de

aire. En línea con esta observación, en el presente estudio los mejores resultados se obtuvieron a velocidad de agitación constante (600 rpm) y controlando la TOD con la aireación, la cual varió entre 0.1 y 1.7 vvm (Fig. 2.13 C). Bajo estas condiciones operacionales, el oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 25 % a lo largo del proceso y se produjeron 380 U/ml de actividad PGasa después de 240 horas de cultivo, lo cual equivale a una productividad global de 1.50 U/ml.h.



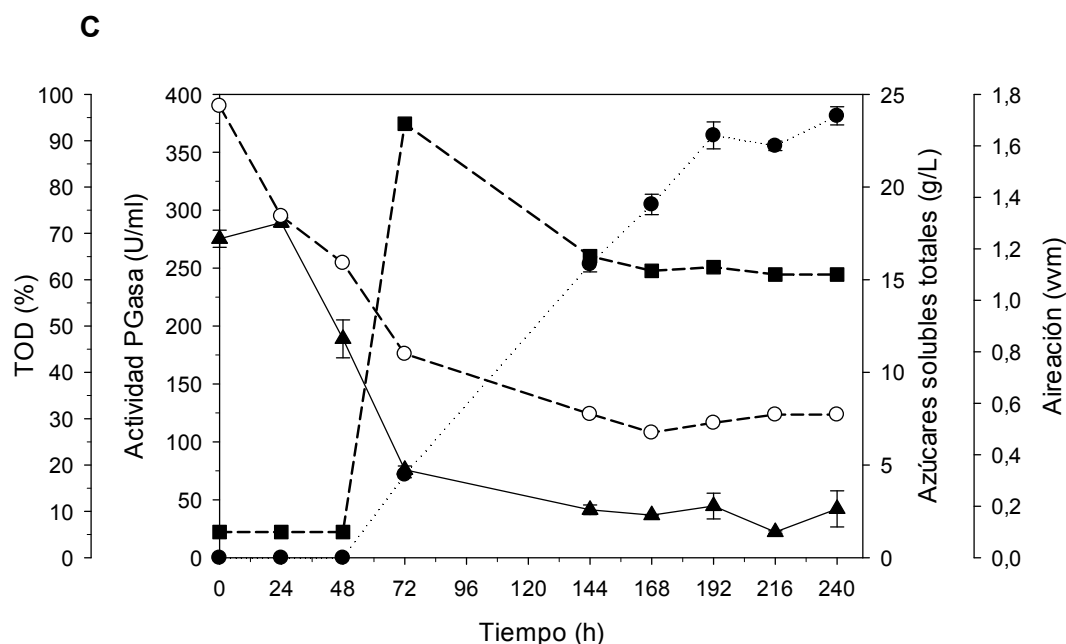


Figura 2.13. Perfil de cultivo de *A. sojae* creciendo con cáscaras de naranja y pomaza de damasco en biorreactores de tanque agitado de 1 L operados a: (A) velocidad de agitación y aireación constantes (1 vvm, 600 rpm), (B) aireación constante (1 vvm) y velocidad de agitación en cascada con la TOD, (C) velocidad de agitación constante (600 rpm) y aireación en cascada con la TOD. Actividad PGasa (●), TOD (○), azúcares totales (▲), velocidad de agitación (□), aireación (■). Los valores corresponden a la media de tres determinaciones y las barras de error representan el desvío estándar de los valores medios.

Comparando estos niveles de actividad PGasa con los reportados previamente con *A. sojae* en fermentaciones sumergidas, resulta evidente la mejora en la producción, como se describe a continuación. La actividad PGasa obtenida cuando *A. sojae* ATCC 20235 se cultivó en matraces Erlenmeyer con maltrina como principal fuente de carbono y energía fue 17 U/ml [Tari et al., 2007]. El agregado de cáscaras de naranja a este medio de cultivo rindió 93.5 y 110 U/ml en cultivos en matraces Erlenmeyer y biorreactores de tanque agitado de 1 litro, respectivamente [Göğüş et al., 2014], empleando la cepa mutante de *A. sojae*. En otro estudio con esta cepa superproductora, se ensayó un medio de cultivo pre-optimizado conteniendo cáscaras de naranja y jarabe de remolacha azucarera en un biorreactor de tanque agitado de 5 litros, resultando 145 U/ml de actividad PGasa [Buyukkileci et al., 2011]. Este mismo grupo de trabajo llevó la producción a 244 U/ml cultivando *A. sojae* superproductor en modalidad de batch-alimentado con cáscaras de naranja [Buyukkileci et al., 2015]. Por consiguiente, se puede

concluir que la utilización de cáscaras de naranja en combinación con pomaza de damasco mejoró la producción con la cepa superproductora de *A. sojae* aproximadamente 1.5 veces con respecto a los estudios previos.

En cuanto a reportes de literatura relacionados a la producción de PGasas con otros microorganismos, los hay en abundancia y con mucha variación en los niveles alcanzados; Favela-Torres et al. [2006] recogen diversos trabajos en una revisión sobre el tema que sirven para ilustrar este aspecto. Sin embargo, los mejores rendimientos se han obtenido mediante el cultivo de hongos filamentosos. Uno de los más elevados hasta la fecha se encuentra descrito en Teixeira et al. [2000], reportándose 500 U/ml producidos por *A. japonicus* a partir de pectina y glucosa como fuentes de carbono y energía. Por lo tanto, puede afirmarse que las 380 U/ml obtenidas en el presente estudio se encuentran entre los niveles más elevados reportados en literatura. Cabe mencionar que las comparaciones de este párrafo se realizaron como unidades de actividad por mililitro de cultivo (U/ml) definidas en todos los casos de la misma forma, esto es, 1 U equivalente a 1 μ mol de azúcares reductores por minuto.

Resulta importante recalcar que los estudios de producción de PGasa con cáscaras de naranja y pomazas de durazno y damasco se llevaron a cabo con una cepa mutante de *A. sojae*, descendiente de la cepa parental *A. sojae* ATCC 20235 empleada en los ensayos de producción con cáscaras de soja – así como en el resto de esta tesis –, siendo el microorganismo la razón fundamental de la diferencia en los niveles de producción observados entre los cultivos con ambas cepas.

Los estudios de producción de PGasa en medios de cultivo con pomazas de durazno y damasco, a partir de los cuales se obtuvieron los resultados presentados en la segunda mitad de este capítulo, se realizaron en el Izmir Institute of Technology (IZTECH) de Izmir, Turquía, dada la importancia de estos residuos en dicho país.

Conclusiones

A partir de cultivos sumergidos de *A. sojae* ATCC 20235 con varios subproductos de origen vegetal derivados del procesamiento de frutas y leguminosas, se observó que los cítricos – esto es, cáscaras de naranja y pomaza de limón y lima – rindieron mayor actividad PGasa. Las cáscaras de soja, un

subproducto abundante en Argentina y de poco valor, resultaron una fuente de carbono interesante para la producción de PGasa con la cual realizar estudios de optimización. Mediante la aplicación de una metodología de diseño de experimentos se logró duplicar el rendimiento en actividad PGasa por gramo de cáscara de soja en cultivos en matraces Erlenmeyer, siendo el pH inicial del cultivo la variable que mayor influencia ejerce en la producción enzimática. En este sentido, un ambiente ácido favorece la producción enzimática, tanto más cuanto más severas son las condiciones de acidez, hasta llegar a un valor de productividad máxima en torno a un pH inicial de 2.60; valores por sobre o por debajo del anterior en tan solo 0.3 o 0.4 unidades de pH conllevan a una disminución sensible en la producción de actividad PGasa. Estos resultados parecen estar conectados en menor medida al desarrollo de *A. sojae* en micelio disperso por sobre la morfología de pellets, pero en mayor medida a una inducción de la expresión del/los gen/es respectivo/s en condiciones de elevada acidez. Mismo rendimiento en actividad PGasa se obtuvo llevando a cabo el bioproceso en matraces Erlenmeyer y en biorreactores de tanque agitado con el medio de cultivo optimizado. Al duplicar la concentración de éste en biorreactor, sin embargo, el rendimiento por gramo de sustrato disminuyó de 1.39 U a 1.02 U, probablemente resultado de problemas de limitación por oxígeno.

Por otro lado, el estudio de la producción de PGasa a partir de cáscaras de naranja y pomaza de durazno y damasco en Erlenmeyer empleando una cepa de *A. sojae* superproductora de PGasa resultó en niveles de actividad aproximadamente similares con los tres residuos. Al realizarse cultivos en biorreactores de tanque agitado empleando una mezcla de cáscara de naranja y pomaza de damasco se identificó, al igual que para el caso de los cultivos con cáscaras de soja, al fenómeno de transferencia de oxígeno como principal limitante para alcanzar una producción óptima de PGasa. La mejor estrategia para controlar la TOD resultó ser a partir de cambios en el flujo de aire realizados en cascada, mientras la velocidad de agitación se fijó a un mismo valor a lo largo del cultivo; así se obtuvieron finalmente 380 U/ml, lo cual representó un incremento de 1.5 veces respecto del cultivo realizado en condiciones de agitación y flujo de aire constantes.

Referencias bibliográficas

- Al Loman A, Ju LK (2016) Soybean carbohydrate as fermentation feedstock for production of biofuels and value-added chemicals. *Process Biochem* **51**:1046 – 1057.
- Galiotou-Panayotou M, Kapantai M, Kalantzi O (1997) Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**:425– 429.
- Bandaiphet C, Prasertsan P (2006) Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, kLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydr Polym* **66**:216 – 228.
- Bergmeyer HU, Bernt E (1965) D-glucose: determination with glucose oxidase and peroxidase. *Methods Enzym Anal* **3**:1212 – 1215.
- Blandino A, Iqbalsyah T, Pandiella S, Cantero D, Webb C (2002) Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**:164 – 169.
- Botella C, Diaz A, de Ory I, Webb C, Blandino A (2007) Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochem* **42**:98 – 101.
- Botella C, De Ory I, Webb C, Cantero D, Blandino A (2005) Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem Eng J* **26**:100 – 106.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248 – 254.
- Brereton R (2003) Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. John Wiley & Sons, Chichester.
- Buyukkileci AO, Fernández-Lahore M, Tari C (2015) Utilization of orange peel, a food industrial waste, in the production of exo-polygalacturonase by pellet forming *Aspergillus sojae*. *Bioprocess Biosyst Eng* **38**:749 – 760.
- Buyukkileci AO, Tari C, Fernández-Lahore M (2011) Enhanced production of exo-polygalacturonase from agro-based products by *Aspergillus sojae*. *BioResources* **6**:3452 – 3468.
- Candioti LV, De Zan MM, Cámara MS, Goicoechea HC (2014) Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* **124**:123 – 138.
- Carlsen M, Spohr AB, Nielsen J, Villadsen J (1996) Morphology and physiology of an α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol Bioeng* **49**:266 – 276.
- Cassales A, de Souza-Cruz PB, Rech R, Ayub MAZ (2011) Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. *Biomass Bioenergy* **35**:4675 – 4683.

- Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF (1999) Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnol Tech* **13**:385 – 390.
- Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF (2000) Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. *J Ind Microbiol Biotechnol* **25**:260 –265.
- Chaney AL, Marbach EP (1962) Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem* **8**:130 –132.
- Coffman AM, Li Q, Ju LK (2014) Effect of natural and pretreated soybean hulls on enzyme production by *Trichoderma reesei*. *J Am Chem Oil Soc* **91**:1331 – 1338.
- Corredor DY, Sun XS, Salazar JM, Hohn KL, Wang D (2008) Enzymatic hydrolysis of soybean hulls using dilute acid and modified steam-explosion pretreatments. *J Biobased Mater Bioenergy* **2**:43 – 50.
- Cui YQ, van der Lans RGJM, Luyben KC (1998) Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng* **57**:409–419.
- de Vries RP, Jansen J, Aguilar G, Pařenicová L, Joosten V, Wulfert F, ... , Visser J (2002) Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. *FEBS Lett* **530**:41 – 47.
- Deckwer WD, Jahn D, Hempel DC, Zeng AP (2006) System biology approach to bioprocess development. *Eng Life Sci* **6**:455 – 469.
- Díaz AB, de Ory I, Caro I, Blandino A (2012) Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. *Food Bioprod Process* **90**:72 – 78.
- Doehlert DH (1970) Uniform shell designs. *Appl Stat* **19**:231 – 239.
- Driouch H, Sommer B, Wittmann C (2010) Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol Bioeng* **105**:1058 – 1068.
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**:350–356.
- Dynesen J, Nielsen J (2003) Surface hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* conidiospores and its role in pellet formation. *Biotechnol Prog* **19**:1049 –1052.
- Favela-Torres E, Volke-Sepúlveda T, Viniegra-Gonzalez G (2006) Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technol Biotechnol* **44**:221 – 227.
- Fontana RC, Polidoro TA, da Silveira MM (2009) Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Bioresour Technol* **100**:4493 – 4498.
- Gibbs PA, Seviour RJ, Schmid F (2000) Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit Rev Biotechnol* **20**:17–48.

- Giese EC, Dekker RF, Barbosa AM (2008) Orange bagasse as substrate for the production of pectinase and laccase by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in submerged and solid state fermentation. *BioResources* **3**:335 – 345.
- Gogus N, Evcan E, Tari C, Cavalitto SF (2015) Evaluation of agro-industrial wastes, their state, and mixing ratio for maximum polygalacturonase and biomass production in submerged fermentation. *Environ Technol* **36**:1 – 11.
- Göğüş N, Hakgüder Taze B, Demir H, Tari C, Unluturk S, Fernández-Lahore M (2014) Evaluation of orange peel, an industrial waste, for the production of *Aspergillus sojae* polygalacturonase considering both morphology and rheology effects. *Turk J Biol* **38**:537 – 548.
- Gogus N, Tari C, Oncü S, Unluturk S, Tokatli F (2006) Relationship between morphology, rheology and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 in submerged cultures. *Biochem Eng J* **32**:171–178.
- Grimm LH, Kelly S, Hengstler J, Göbel A, Krull R, Hempel DC (2004) Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. *Biotechnol Bioeng* **87**:213 – 218.
- Heerd D, Tari C, Fernández-Lahore M (2014) Microbial strain improvement for enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus sojae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**:7471 –7481.
- Hille A, Neu TR, Hempel DC, Horn H (2005) Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger*. *Biotechnol Bioeng* **92**:614 – 623.
- Hours RA, Voget CE, Ertola RJ (1988) Apple pomace as raw material for pectinases production in solid state culture. *Biol Wastes* **23**:221 – 228.
- Kaup BA, Ehrich K, Pescheck M, Schrader J (2008) Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: Increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. *Biotechnol Bioeng* **99**:491 –498.
- Kelly S, Grimm L, Hengstler J, Schultheis E, Krull R, Hempel D (2004) Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*. *Bioprocess Biosyst Eng* **26**:315–323.
- Kiran KR, Karanth NG, Divakar S (1999) Preparation of stearyl lactic acid estercatalyzed by lipases from *Rhizomucor miehei* and porcine pancreas optimization using response surface methodology. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**:579 – 584.
- Krull R, Wucherpennig T, Esfandabadi ME, Walisko R, Melzer G, Hempel DC, Kampen I, Kwade A, Wittmann C (2013) Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J Biotechnol* **163**:112 –123.
- Li Q, Al Loman A, Coffman AM, Ju LK (2017) Soybean hull induced production of carbohydrases and proteases among *Aspergillus* and their effectiveness in soy flour carbohydrate and protein separation. *J Biotechnol* **248**:35 – 42.
- Malvessi E, Silveira MMD (2004) Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Braz Arch Biol Technol* **47**:693 – 702.

- Mandenius CF, Brundin A (2008) Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnol Prog* **24**:1191 – 1203.
- Martín MA, Siles JA, Chica AF, Martín A (2010) Biomethanization of orange peel waste. *Bioresource Technol* **101**:8993 – 8999.
- Mielenz JR, Bardsley JS, Wyman CE (2009) Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresour Technol* **100**:3532 – 3539.
- Moreira GM, Reis S, Costa MAF, Souza CGM, Peralta RM (2005) Production of hydrolytic enzymes by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria* in submerged cultures. *Braz J Microbiol* **36**:7–11.
- Nelson N (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* **153**:375 – 380.
- Nielsen J (1996) Modelling the morphology of filamentous microorganisms. *Trends Biotechnol* **14**:438 – 443.
- Pagán J, Ibarz A, Llorca M, Pagán A, Barbosa-Cánovas GV (2001) Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Res Int* **34**:605 – 612.
- Paganini C, Nogueira A, Silva NC, Wosiacki G (2005) Utilization of apple pomace for ethanol production and food fiber obtainment. *Cienc Agrotecnol* **29**:1231 – 1238.
- Papagianni M (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* **22**:189 – 259.
- Peñalva MA, Tilburn J, Bignell E, Arst Jr HN (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol* **16**:291 – 300.
- Prusky D, Yakobi N (2003) Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Mol Plant Pathol* **4**:509 – 516.
- Quintanilla D, Hagemann T, Hansen K, Gernaey KV (2015) Fungal Morphology in Industrial Enzyme Production—Modelling and Monitoring. In: Krull R, Bley T (eds) *Filaments in Bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 149. Springer, Cham.
- Ride JP, Drysdale RB (1972) A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiol Plant Pathol* **2**:7 –15.
- Rollins JA (2003) The *Sclerotinia sclerotiorum pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **16**:785 – 795.
- Rollins JA, Dickman MB (2001) pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a *pacC/RIMI* homolog. *Appl Environ Microbiol* **67**:75 – 81.
- Ruiz HA, Rodríguez-Jasso RM, Rodríguez R, Contreras-Esquivel JC, Aguilar CN (2012) Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochem Eng J* **65**:90 – 95.
- Sanal IS, Güvenç A, Salgin U, Mehmetoglu Ü, Calimli A (2004) Recycling of apricot pomace by supercritical CO₂ extraction. *J Supercrit Fluids* **32**:221 – 230.

- Schirmer-Michel AC, Hickmann Flores S, Hertz PF, Souza Matos G, Záchia Ayub MA (2008) Production of ethanol from soybean hydrolysate by osmotolerant *Candida guilermundii* NRRL Y-2075. *Bioresour Technol* **99**:2898 – 2904.
- Somogyi M (1952) Notes on sugar determination. *J Biol Chem* **195**:19 –23.
- Tari C, Göğüs N, Tokatli F (2007) Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. *Enz Microb Technol* **40**:1108 – 1116.
- Teixeira MFS, Lima Filho JL, Durán N (2000) Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Braz J Microbiol* **31**:286–290.
- Teixeira JA, Ribeiro Corrêa TL, Queiroz MV, Fernandes de Araújo E (2014) pH-dependent effect of pectinase secretion in *Penicillium griseoroseum* recombinant strains. *J Basic Microbiol* **54**:133 – 141.
- Ucuncu C, Tari C, Demir H, Buyukkileci AO, Ozen B (2013) Dilute-acid hydrolysis of apple, orange, apricot and peach pomaces as potential candidates for bioethanol production. *J Biobased Mater Bioenergy* **7**:376–389.
- Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M (2003) Effects of process parameters on heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation. *J Chem Technol Biotechnol* **78**:1259 – 1266.
- Wood TM, Bhat KM (1988) Methods for measuring cellulose activities. *Methods Enzymol* **160**:87 – 112.
- Yapo BM, Lerouge P, Thibault JF, Ralet MC (2007) Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydr Polym* **69**:426 – 435.
- Zhang J, Zhang J (2016) The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. *Crit Rev Biotechnol* **36**:1066 –1077.

Capítulo 3

Purificación y determinación de propiedades bioquímicas y cinéticas de una endopoligalacturonasa de *Aspergillus sojae* ATCC 20235

Resumen

En este capítulo se describe la producción, purificación y posterior caracterización de una endo-poligalacturonasa producida por *Aspergillus sojae* en cultivos sumergidos, utilizando como fuente única de carbono y energía cáscara de naranja. A partir del seguimiento de la cinética de producción de *A. sojae* en un medio de cultivo compuesto por cáscara de naranja molida y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se escogió cosechar el cultivo a las 168 horas desde iniciado, por ser el momento en el cual la actividad enzimática, determinada por dos métodos distintos, alcanzó valores máximos. Una vez obtenido un sobrenadante libre de biomasa y partículas provenientes del medio de cultivo, la purificación se realizó por medio de una serie de pasos cromatográficos de intercambio iónico y exclusión molecular. Según análisis electroforéticos, se obtuvo una fracción homogénea con un PM de 47 kDa y un pI de 4.2.

A destacar, la enzima probó ser considerablemente estable frente a condiciones desde muy ácidas hasta neutras (pH 1.5-6.5) y presentó un valor de K_M particularmente bajo, 0.134 mg/ml, lo que da cuenta de su elevada afinidad por su sustrato. En condiciones estáticas la PGasa resultó ser completamente estable hasta 45° C, y presentó una vida media de inactivación térmica de 2 horas a 50° C. Además de su actividad frente a ácido poligalacturónico (APG) y pectina, la enzima exhibió actividad solubilizadora de pectina, siendo su rango de actividad óptima sustrato-dependiente, si bien actúa mejor en un rango de pH concertado de 3.3-5.0. Los análisis por cromatografía en capa fina (CCF) revelaron que el tri-galacturonano es el principal producto final de hidrólisis de APG, indicando el carácter endo- de la PGasa. La enzima permaneció estable y su actividad inalterada frente a SO_2 , etanol y varios cationes ensayados excepto Hg^{2+} , el cual inactivó la actividad por completo. Estas propiedades convierten a la endo-PGasa de *A. sojae* en un potencial candidato para ser utilizado en los procesos de extracción y clarificación de jugos de fruta, y durante la elaboración de vino en la etapa pre-fermentativa de desfangado de mosto.

Introducción

La caracterización de enzimas es esencial para determinar el alcance de sus potenciales aplicaciones industriales. Sin embargo, el estudio de las propiedades bioquímicas y cinéticas de una enzima a partir de un extracto crudo – en el caso de las enzimas extracelulares microbianas, típicamente el sobrenadante de un cultivo - tiene el inconveniente de que éste puede contener sustancias que actúen afectando negativamente el desempeño del biocatalizador o, a la inversa, compuestos estabilizantes. En definitiva, las propiedades enzimáticas pueden verse alteradas por la presencia de compuestos concomitantes en el extracto crudo. A su vez, en el caso particular de enzimas como las pectinasas, dada la complejidad estructural de la pectina y el, consecuentemente, elevado número de enzimas capaces de degradarla o modificar su estructura química, la caracterización enzimática a partir de un extracto crudo puede llevar a resultados no necesariamente confiables ya que resulta difícil determinar si el efecto estimado se debe a la acción de una o varias enzimas [Pedrolli & Carmona, 2010]. Por lo tanto, para estudiar inequívocamente las propiedades de pectinasas es esencial una purificación previa.

En su gran mayoría las pectinasas han sido purificadas mediante métodos cromatográficos [Gummadi & Panda, 2003; Pedrolli et al., 2009]. Generalmente se emplean diferentes técnicas cromatográficas tales como cromatografías de intercambio iónico, interacción hidrofóbica y exclusión molecular [Gummadi & Panda, 2003; Pedrolli et al., 2009; Byrne et al., 2017], las cuales suelen aplicarse en combinación, aunque el número de etapas necesarias está directamente relacionado con la complejidad del extracto crudo empleado como material de partida. Por otra parte, métodos de cromatografía de afinidad [Camperi et al., 1996] o de recuperación en un paso por partición de tres fases [Sharma & Gupta, 2001] han sido utilizados en pocas oportunidades. Esta última técnica fue empleada por Dogan & Tari [2008] para aislar una PGasa de un extracto crudo de *A. sojae* ATCC 20235, logrando una purificación parcial de la misma.

La separación de proteínas aplicando técnicas cromatográficas se basa en la combinación única de características de la misma. La cromatografía de intercambio iónico separa a las proteínas en base a su carga, mientras que la cromatografía de exclusión molecular lo hace en base a su tamaño y conformación. Por otro lado, mediante la cromatografía de interacción hidrofóbica

se logra la separación de proteínas basándose en la hidrofobicidad y la cromatografía de afinidad emplea un ligando al cual la proteína de interés se une específicamente. Dentro de las pectinasas fúngicas que depolimerizan el HG, la mayoría de las liasas tienen un peso molecular de entre 18 y 53 kDa [Yadav et al., 2009], mientras que el tamaño de las PGasas suele variar entre 25 y 82 kDa [Niture, 2008], aunque se han reportado casos de PGasas fúngicas de 20 kDa [Borin et al., 1996] y 13 kDa [Fogarty & Kelly, 1983]. Existe una gran variabilidad en lo que respecta al punto isoelectrico (pI), habiéndose reportado liasas fúngicas con valores de pI que van desde 5.0 hasta 10.0 [Yadav et al., 2009] y PGasas de hongos con pIs en el rango 3.2 – 8.3 [Niture, 2008].

En el capítulo 2 se estudió la producción de actividad PGasa a partir de algunos residuos agroindustriales, entre los cuales se encuentran las cáscaras de naranja. El objetivo de los estudios detallados en presente capítulo fue purificar la enzima responsable mayoritaria de la actividad PGasa obtenida en cultivos con cáscaras de naranja, y determinar sus propiedades bioquímicas y cinéticas.

Materiales y métodos

Reactivos

La pectina cítrica (AGA = 93.5 %), pectina de manzanas (AGA \geq 75 %), APG (sal sódica, AGA = 90%), ácido tri-galacturónico, AGA, m-hidroxidifenilo y seroalbúmina bovina se adquirieron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, EUA). Las cáscaras de naranja, gentilmente cedidas por una compañía citrícola local, se secaron a 60° C en estufa durante dos días y se molieron con un molinillo de laboratorio (Cyclotec 1093 SampleMill, Tecator, Suecia), obteniéndose un polvo fino, de tamaño de partícula tal que logra pasar por un tamiz de Malla 35 mientras que es retenido completamente por un tamiz de Malla 150 (500 μm > \varnothing > 105 μm). Los demás químicos y reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Determinación del grado de esterificación de la pectina

Las pectinas cítrica y de manzanas se caracterizaron en lo que a grado de esterificación (GE) respecta. Para ello se siguió el método titulométrico delineado en Singthong et al. [2004]. A saber, 10 ml de una solución de pectina al 1% (p/v) se titularon con NaOH 0.05 M utilizando fenolftaleína como indicador de pH

(valoración A) y posteriormente se añadieron 2 ml de NaOH 0.5 M, dejando reposar la solución durante 30 minutos con el fin de desesterificar la pectina. Acto seguido, previa neutralización de la solución con HCl 0.5 M se realizó una segunda titulación con NaOH 0.05 M (valoración B). Los volúmenes de base gastados en ambas titulaciones se utilizaron para calcular el GE mediante la siguiente ecuación:

$$GE (\%) = \frac{\text{valoración B}}{\text{valoración A} + \text{valoración B}} \cdot 100$$

Condiciones de cultivo para la producción enzimática

A. sojæ ATCC 20235 se cultivó en matraces Erlenmeyer de 1000 ml con 200 ml de un medio de cultivo compuesto de cáscaras de naranja molidas (40 g/L) y (NH₄)₂SO₄ (2.75 g/L). El pH inicial del medio de cultivo se ajustó a 3.30 previa inoculación con 1.4x10⁵ conidios/ml, obtenidos tal como se detalla en el capítulo 2. Los cultivos se llevaron a cabo a 30° C con agitación orbital a 200 rpm durante 210 horas. Se tomaron muestras de 2 ml cada 12 horas, las cuales se centrifugaron a 3500×g por 20 minutos, y los sobrenadantes resultantes se utilizaron para ensayar distintas actividades enzimáticas y contenido de proteínas totales. Como punto de partida para la purificación se empleó el sobrenadante resultante de extraer y centrifugar (3500×g, 20 min) el contenido total de los matraces Erlenmeyer, al cual se lo denominó extracto crudo.

Ensayos enzimáticos y determinación de proteínas totales

Las medidas de actividad enzimática se llevaron a cabo a 35° C y pH 5.0, a menos que se indique lo contrario.

Actividad poligalacturonasa (PGasa): se determinó cuantificando, mediante la metodología de Somogyi-Nelson, la concentración de azúcares reductores generada tras la incubación de la muestra enzimática con APG, tal como se describe en el capítulo 2.

Actividad endo-pectinasa: se ensayó y calculó según Gusakov et al. [2002], mediante el registro continuo de disminución de viscosidad de una solución de pectina, empleando un viscosímetro Cannon-Fenske número 100 termostatzado. Brevemente, al viscosímetro previamente cargado con 5 ml del sustrato se le

añade 0.1 ml de muestra, se homogeneiza la mezcla de reacción y se registra el tiempo que demora el líquido en recorrer la distancia entre los aforos del viscosímetro; el procedimiento se realiza cuatro o cinco veces para cada muestra enzimática. El incremento lineal en el tiempo del cociente entre la viscosidad relativa de la solución del sustrato y la viscosidad relativa de la mezcla de reacción es proporcional a la actividad endo-pectinasa de la muestra. Se definió una unidad de actividad endo-pectinasa como la cantidad de enzima requerida para lograr un 50 % de reducción en la viscosidad de la solución de pectina en 10 minutos de reacción.

Actividad pectin-liasa: se determinó espectrofotométricamente a 235 nm, mediante medida de la velocidad de formación de productos insaturados de reacción a partir de pectina de alto GE ($\epsilon_{235} = 5500/\text{M.cm}$) [Edstrom & Phaff, 1964], resultantes de mezclar 380 μl de sustrato con 20 μl de muestra. Una unidad de actividad pectin-liasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de productos 4,5-insaturados por minuto.

Actividad pectinesterasa: se realizaron en forma cualitativa, adaptando el procedimiento detallado en Vilariño et al. [1993] a escala de microplaca de 96 pocillos. Para ello se mezclaron 5 μl de muestra con 195 μl de una solución de pectina a la que previamente se le había agregado unas gotas de verde de bromocresol ($\text{pH } 5.4 > \text{rango de viraje} > \text{pH } 3.8$) y pasadas 16 horas de incubación se registró el cambio de color de las mezclas – debido a la liberación de grupos carboxílicos del sustrato – comparándolas con un blanco de sustrato.

Actividad solubilizadora de pectina o protopectinasa (PPasa): la protopectina de limón utilizada como sustrato se preparó según Cavalitto et al. [1997]. Los ensayos se realizaron en base al protocolo expuesto en Contreras et al. [1999], con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistió en 20 mg de sustrato, 950 μl de buffer ácido cítrico 12.5 mM - Na_2HPO_4 6.25 mM (BCP) y 50 μl de muestra enzimática. Pasados 30 minutos de incubación en baño termostático con agitación, el volumen total se filtró a través de papel Whatman N°1 y el filtrado resultante se utilizó para determinar la cantidad de pectina solubilizada. Dicho ensayo consistió en agregar 3 ml de tetraborato de sodio pre-enfriado (0.0125 M en H_2SO_4 96 %) a 200 μl del filtrado, hervir la solución durante 10 minutos y finalmente adicionar 30 μl de m-hidroxidifenilo (1.5 g/L en solución de NaOH 5 g/L) luego de un paso de enfriado en baño de agua-hielo. Las soluciones resultantes se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y

acto seguido se determinó la absorbancia a 625 nm contra un blanco de reacción. Se utilizó AGA como patrón. Una unidad de actividad PPasa se definió como la cantidad de enzima requerida para solubilizar pectina equivalente a 1 μ mol de AGA por minuto.

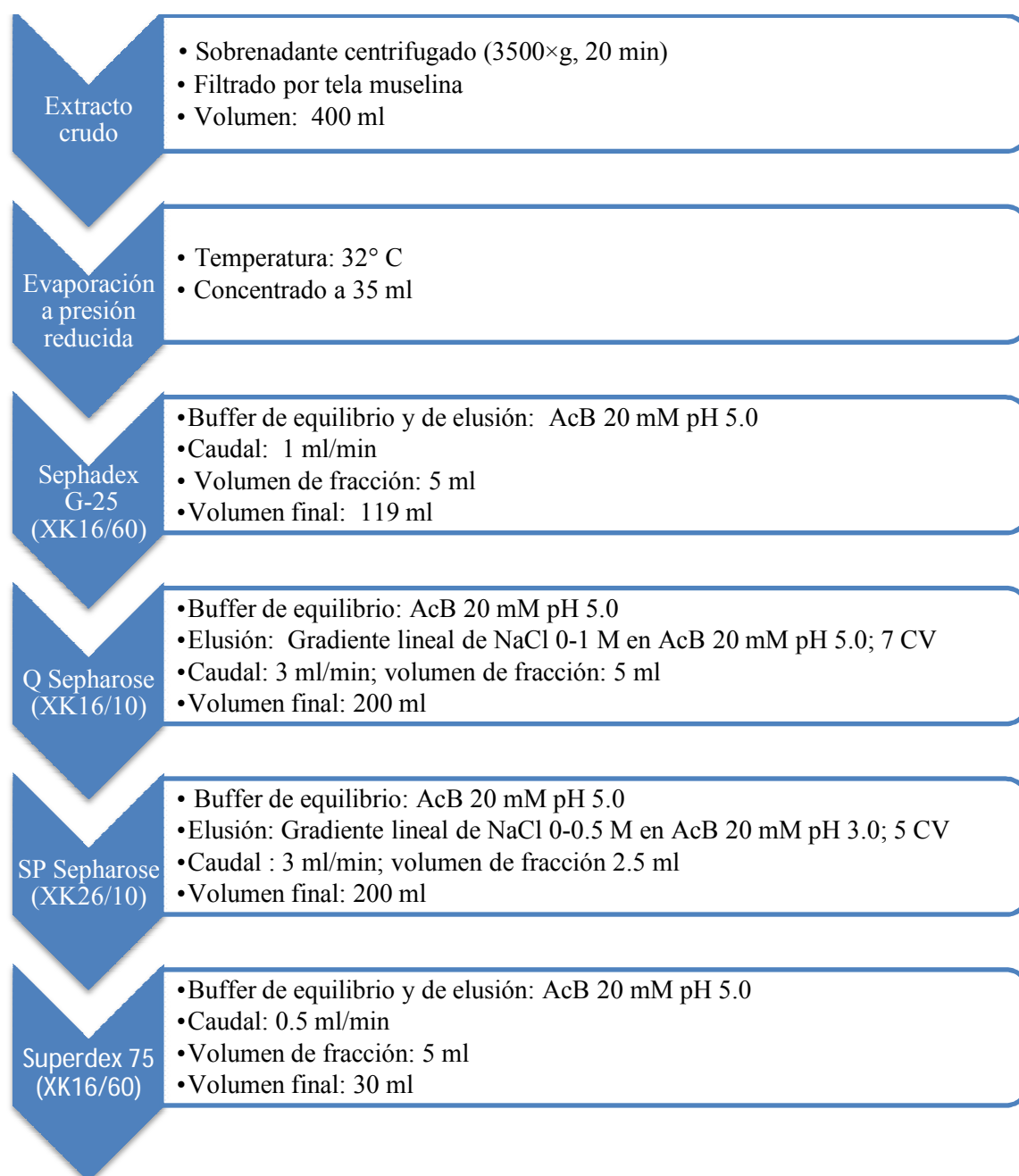
Las pectinas y el APG utilizados como sustratos se prepararon como soluciones 5 g/L y 2 g/L, respectivamente, en buffer acético-acetato de sodio 20 mM (AcB), excepto en los ensayos de actividad pectinesterasa, en los cuales se empleó agua destilada como solvente.

Proteínas totales: el contenido de proteínas totales se cuantificó por el método de Bradford [1976], utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

Protocolo de purificación

El extracto crudo se filtró a través de tela de muselina y, posteriormente, se concentró mediante evaporación a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio a escala banco (TECNAL TE-211) operado a 32° C. Previo re-filtrado por filtros de nitrato de celulosa con tamaño de poro de 0.45 μ m, el concentrado se cargó en una columna de exclusión molecular Sephadex G-25 (XK 16/60, General Electric, Little Chalfont, UK) equilibrada con AcB (20 mM, pH 5.0) y se eluyó de forma isocrática a un caudal de 1 ml/minuto empleando el mismo buffer, colectando fracciones de 5 ml de volumen. Las fracciones que exhibieron actividad PGasa se agruparon y sometieron a cromatografía de intercambio aniónico empleando una columna empacada con una resina Q Sepharose FF (HiLoad 16/10, General Electric) previamente equilibrada con AcB (20 mM, pH 5.0). La elusión de las proteínas adsorbidas se realizó mediante un gradiente lineal de NaCl (0.0-1.0 M) en AcB (20 mM, pH 5.0) en siete volúmenes de columna a un caudal de 3 ml/minuto. Aquellas fracciones colectadas que resultaron positivas para actividad PGasa se juntaron, se concentraron por liofilización y se desalaron en buffer AcB (20 mM, pH 3.0) utilizando la resina de exclusión molecular Sephadex G-25 empacada en una columna XK 16/60 (General Electric), para su posterior aplicación a una columna de intercambio catiónico (SP Sepharose FF, Hi Load 26/10) pre-equilibrada con el buffer empleado en el paso de desalado. Las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl (0.0-0.5 M) en AcB (20 mM, pH 3.0) a 3 ml/minuto en cinco volúmenes de columna. Luego de analizar las fracciones de 2.5 ml de volumen colectadas, aquellas que mostraron

actividad PGasa se agruparon para ser concentradas por liofilización, resuspendidas en 1 ml de AcB (20 mM, pH 5.0) y finalmente inyectadas en una columna de exclusión molecular Superdex 75 (XK 16/60, General Electric), pre-equilibrada con AcB (20 mM, pH 5.0). La elución se llevó a cabo en forma isocrática en AcB (20 mM, pH 5.0) a 0.5 ml/minuto, y las fracciones positivas para actividad PGasa se agruparon y se conservaron a -20°C para ser utilizadas en los ensayos de caracterización. El proceso de purificación seguido en este trabajo se resume el siguiente esquema:



Las cromatografías en columna se realizaron en forma automática, utilizando un equipo de FPLC (AKTA FPLC-U900, General Electric).

Electroforesis

Se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según Laemmli [1970] en un equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Biorad). Los geles se prepararon al 12 % de acrilamida y las muestras premezcladas con el buffer de siembra conteniendo β -mercaptoetanol se calentaron a 100° C, antes de proceder a la siembra. Una vez finalizada la corrida electroforética, todo el gel o una parte del mismo se sometió a tinción con Coomassie G-250 coloidal [Neuhoff et al., 1988], mientras que la otra parte se analizó por zimograma. Para esto último, los geles se sumergieron en una solución de Tritón X-100 al 2.5 % (p/v) preparada en buffer AcB (20 mM, pH 5.0) durante 60 minutos con agitación orbital, con el fin de renaturalizar la enzima. Acto seguido, los geles se enjuagaron 4 o 5 veces con agua destilada para eliminar el detergente, y se incubaron a 37° C en una solución de APG al 0.2 % (p/v) por 45 minutos, con agitación manual periódica. Finalizado el período de incubación, los geles se enjuagaron con agua destilada y las bandas con actividad PGasa se visualizaron como zonas claras (rosadas o incoloras) en un fondo rojo luego de un paso de teñido con una solución acuosa de rojo de rutenio al 0.02 % (p/v). El peso molecular de la proteína se estimó por SDS-PAGE, mediante registro y comparación del tamaño de las bandas obtenidas utilizando un kit de marcadores de peso molecular (20-120 kDa; Thermo Scientific, Rockford IL, EUA); para dicha estimación se utilizaron datos provenientes de 5 corridas electroforéticas distintas.

El isoelectroenfoque (IEF) se realizó en una unidad de electroforesis Multiphor II IEF (General Electric) a 8° C, y se prepararon geles de 5% (p/v) de acrilamida con 2% de anfolitos en el rango de 3-10 (Pharmalyte, General Electric). Como buffer catódico y anódico se utilizaron soluciones de H₂SO₄ 0.1 M y NaOH 0.1 M, respectivamente. Para determinación del punto isoeléctrico (pI), las muestras se focalizaron junto con marcadores de pI (Broad Range pI Kit, General Electric). Las bandas proteicas se tiñeron con Coomassie R-250 para su visualización.

Propiedades bioquímicas

Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática

La estabilidad frente al pH de la enzima purificada se examinó en un rango de 1.0 – 6.5, mediante medida de la actividad PGasa residual luego de incubación por 2 o 24 horas a 20° C en buffer BCP preajustado al valor de pH deseado.

Efecto del pH sobre la actividad enzimática

La influencia del pH en la actividad de la enzima purificada se determinó utilizando como sustrato APG, pectina cítrica, y protopectina de limón en un rango de pH de 2.3 – 6.5. Los sustratos se disolvieron – la protopectina se suspendió- en BCP, preajustado al valor de pH requerido, y se determinó la actividad PGasa o PPasa, según el caso, bajo condiciones de ensayo estándar.

Efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática

La estabilidad térmica de la enzima purificada se estudió mediante incubación durante 210 minutos a diferentes temperaturas en un baño termostatzado, en el intervalo de 40 a 60° C. De cada mezcla de incubación se retiraron alícuotas a intervalos regulares de tiempo, y se ensayó la actividad PGasa residual en condiciones estándar.

Influencia de iones metálicos y otros químicos en la actividad enzimática

El efecto de los cationes Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , K^{+} y Hg^{2+} se estudió mediante incubación de la enzima purificada durante 2 horas en presencia de cada uno de estos iones metálicos por separado, en concentración 1 mM. A su vez, se estudiaron posibles efectos del β -mercaptoetanol (2 mM), etilendiaminotetraacetato (EDTA, 5 mM), etanol (15% v/v), metanol (15 % v/v) y dióxido de azufre (SO_2 , 100 mg/L), procediendo como se describió más arriba. Finalizada la incubación, se determinó actividad PGasa bajo condiciones estándar de reacción y el resultado se expresó como actividad residual porcentual respecto a un control, el cual fue incubado sin el agregado adicional de ningún químico distinto de los utilizados en el ensayo de actividad estándar.

Determinación de parámetros cinéticos

Las constantes cinéticas K_M and V_{MAX} de la enzima purificada se calcularon ajustando los valores de actividad PGasa determinados en un rango de

concentración de APG de 0.09-9.00 g/L a una regresión lineal luego de aplicar la ecuación de Hanes-Hultin [Hultin, 1967]:

$$\frac{S_0}{V_0} = \frac{K_M}{V_{MAX}} + \frac{S_0}{V_{MAX}}$$

donde S_0 y V_0 corresponden a la concentración inicial de sustrato y a la velocidad inicial de reacción, respectivamente.

El número de recambio o k_{cat} , definido como el número de moléculas de producto generado por cada molécula de enzima y por unidad de tiempo, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$k_{cat} = \frac{V_{MAX}}{E_T}$$

siendo E_T la concentración de la enzima que, para el caso de la PGasa, se determinó utilizando la concentración de proteínas de la fracción purificada y el peso molecular calculado a partir de los ensayos de SDS-PAGE.

La constante de inhibición, k_I , referente a la inhibición ejercida por los productos finales de la degradación enzimática de APG, se calculó luego de realizar los gráficos de Dixon [Dixon, 1953] con los datos recabados de dos series diferentes de determinaciones de actividad PGasa utilizando distintas cantidades de productos finales de reacción; una serie de ensayos se realizó con 0.375 g/L de APG, mientras que para la otra se utilizó APG en concentraciones de 0.425 g/L. La ecuación que se utiliza para realizar los gráficos de Dixon tiene la siguiente forma:

$$\frac{1}{V_0} = (m.I) + b \quad ; \quad S_0 = cte$$

en donde I es la concentración del inhibidor. Dicha ecuación describe una recta cuya pendiente, m , y ordenada al origen, b , se definen de acuerdo al tipo de inhibición que experimenta el sistema (competitiva, no competitiva, etc.), el cual, a su vez, puede determinarse graficando los datos obtenidos a 2 o más concentraciones de sustrato diferentes. El punto de intersección entre las rectas graficadas corresponde a la constante de inhibición, k_I .

Cromatografía en capa fina (CCF)

La composición de los productos de degradación de la enzima purificada se analizó por medio de CCF, realizadas utilizando láminas de aluminio, las cuales

soportan una capa de sílica gel (60 F254, Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA) como fase estacionaria. Para la fase móvil se utilizó n-butanol/ácido acético/agua en las siguientes proporciones relativas: 9/4/7. Luego de la cromatografía, las láminas previamente secadas al aire se sumergieron en una solución 5 g/L de ácido fosfomolibdico en etanol con 4 % de H₂SO₄ y se calentaron hasta visualización de manchas en la placa, correspondientes a derivados químicos de los productos finales de reacción enzimática [Contreras-Esquivel & Voget, 2004]. Alternativamente, la detección de los productos finales de reacción se realizó mediante rociado de las placas con ácido fosfomolibdico en concentración de 3 g/L, disuelto en etanol con 10 % de H₂SO₄, utilizando un pulverizador. Las muestras sometidas al análisis por CCF se obtuvieron mediante incubación de la enzima purificada con una solución 2 g/L de APG en AcB (20 mM, pH 5.0) y retirando alícuotas a varios tiempos de incubación diferentes, las cuales se hirvieron durante 5 minutos para inactivar al biocatalizador. Se calculó un porcentaje de degradación correspondiente a cada alícuota, considerando degradación completa del APG hasta AGA, según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ degradación} = \frac{(\mu\text{moles/ml})_{AGA} \cdot (PM)_{\text{subunidad APG}} \cdot 100}{(\mu\text{g/ml})_{APG}}$$

Los grupos reductores se midieron y expresaron como concentración de AGA, utilizando un patrón de AGA.

Resultados y discusión

Perfil de producción de enzimas pectolíticas de A. sojae

Durante el cultivo de *A. sojae* en un medio de cultivo compuesto por cáscaras de naranja molidas y (NH₄)₂SO₄ se midieron las siguientes actividades pectolíticas: PGasa, endo-pectinasa y pectin-liasa, todas ellas reflejando la acción de enzimas pectolíticas cuyo sitio de acción principal es el homogalacturonano. El curso temporal de la producción de las actividades endo-pectinasa y PGasa se muestra en la Fig. 3.1.

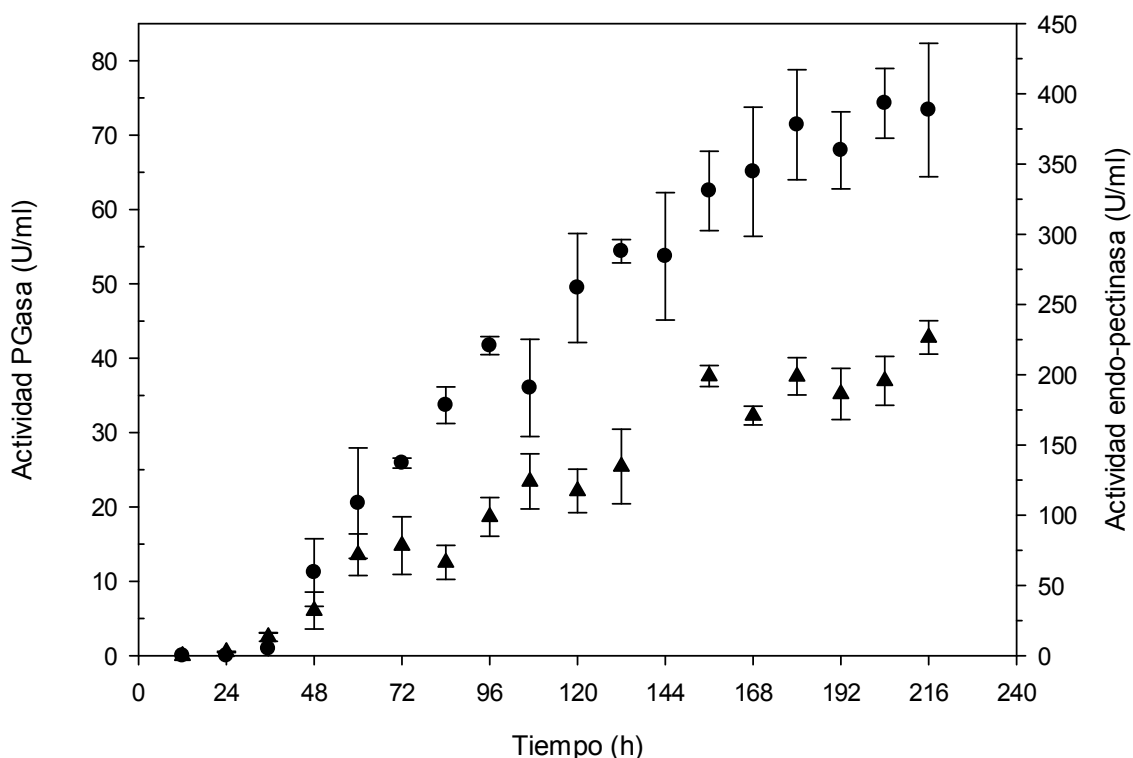


Figura 3.1. Perfil de evolución de las actividades PGasa (●) y endo-pectinasa (▲) en cultivos de *A. sojae* en creciendo con cáscaras de naranja y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las barras de error representan el desvío estándar calculado de tres cultivos réplica.

Como puede verse, el perfil de producción fue similar y ambas actividades aumentaron en paralelo a lo largo del cultivo, llegando a un máximo a partir de las 168 horas en adelante; en consecuencia, el proceso de purificación se realizó a partir de cultivos con una edad de 7 días (Fig. 3.2). Se reportaron cinéticas de producción de actividad PGasa similares por hongos filamentosos en cultivos en frascos agitados [Galiotou-Panayotou et al., 1997; Malvessi and Silveira, 2004]. Por otro lado, en cultivos en sustrato sólido de *A. sojae* sobre afrecho de trigo y cáscaras de naranja los valores máximos de actividad se obtuvieron a las 120 horas de cultivo [Heerd et al., 2012]. Además de actividad PGasa, el extracto crudo presentó actividad pectinesterasa débil, la cual se detectó a las 168 horas de cultivo, luego de 16 horas de incubación a 35° C.

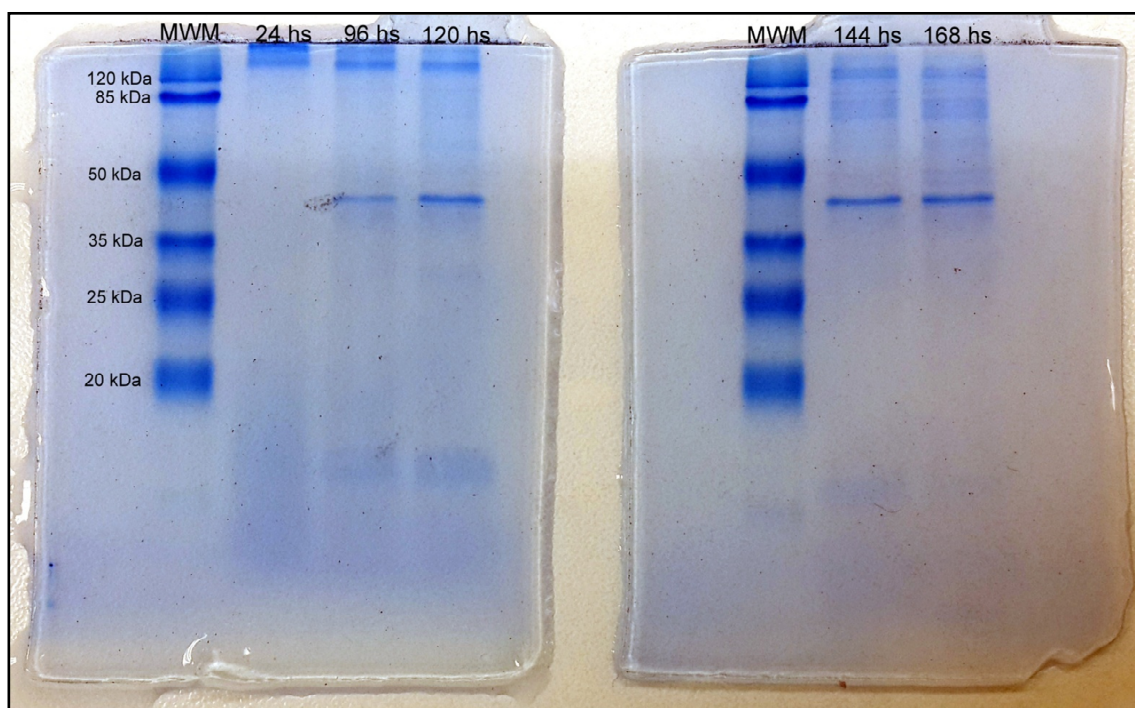


Figura 3.2. SDS-PAGE realizado con muestras extraídas a distintos intervalos de tiempo durante el curso del cultivo de *A. sojae* creciendo con cáscaras de naranja y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Debido a que la actividad endo-pectinasa se determinó utilizando un método viscométrico, el mismo refleja la actividad depolimerizante total sobre pectina, la cual puede ser mayormente ejercida tanto por pectin-liasas como por PGasas. Sin embargo, no se detectó actividad pectin-liasa alguna a lo largo de los cultivos, sugiriendo estos resultados que las actividades PGasa y endo-pectinasa son causa de una –o más de una- endo-poligalacturonasa. Debido a que, contrastando con el ensayo de determinación de actividad PGasa por Somogyi-Nelson, el método viscométrico insume bastante tiempo y permite la detección de pocas muestras en simultáneo, y teniendo en cuenta además que la relación de actividad enzimática endo-pectinasa/PGasa se mantuvo razonablemente constante a lo largo de todo el cultivo, se escogió el método de determinación de actividad PGasa para seguir el proceso de purificación.

Purificación de PGasa de *A. sojae*

Se purificó una PGasa a homogeneidad a partir del sobrenadante de cultivos de *A. sojae* de 7 días de duración, mediante cromatografías de exclusión molecular e intercambio iónico. La Tabla 3.1 resume los resultados obtenidos.

Tabla 3.1. Proceso de purificación de una PGasa de *A. sojae*

Etapas	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	400	14.73	12593	854.7	100	-
Desalado Sephadex G-25	119	10.39	13164	1267	104.5	1.48
Q Sepharose	200	4.07	10657	2619	84.6	3.06
SP Sepharose	200	1.18	9147	7738	72.6	9.05
Superdex 75	30	0.41	5370	13023	42.6	15.2

Como primer paso cromatográfico se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna empacada con una resina Sephadex G-25, con la cual se desalinizó la muestra y se eluyó la fracción proteica virtualmente libre de conductividad en el buffer de la cromatografía de intercambio catiónico. Cabe destacar que la fracción cargada en la primera columna había sido previamente concentrada por evaporación a presión reducida, por lo cual presentaba un color marrón/anaranjado intenso que fue atribuido mayoritariamente a los pigmentos provenientes de las cáscaras de naranja utilizadas como fuente de carbono y energía en el medio de cultivo. El paso de cromatografía de exclusión molecular logró separar de la fracción proteica solamente una parte de los pigmentos presentes originalmente en el extracto crudo. La fracción proteica desalinizada se sometió a dos cromatografías de intercambio iónico sucesivas: una aniónica utilizando una resina Q Sepharose, y otra catiónica en la cual se empleó la resina SP Sepharose. Puede observarse en la Fig. 3.3 que la actividad PGasa eluyó como un pico único a 0.24-0.27 M de NaCl utilizando el intercambiador aniónico y a 0.48-0.50 M de NaCl empleando el intercambiador catiónico. Luego de un paso de pulido final mediante una cromatografía de exclusión molecular utilizando una resina Superdex 75, se logró obtener una fracción homogénea con actividad PGasa con un rendimiento del 42.6 % e incremento de 15.2 veces en actividad específica. La actividad pectinesterasa, presente en el extracto crudo, resultó indetectable luego de la marcha cromatográfica, lo cual es consistente con una

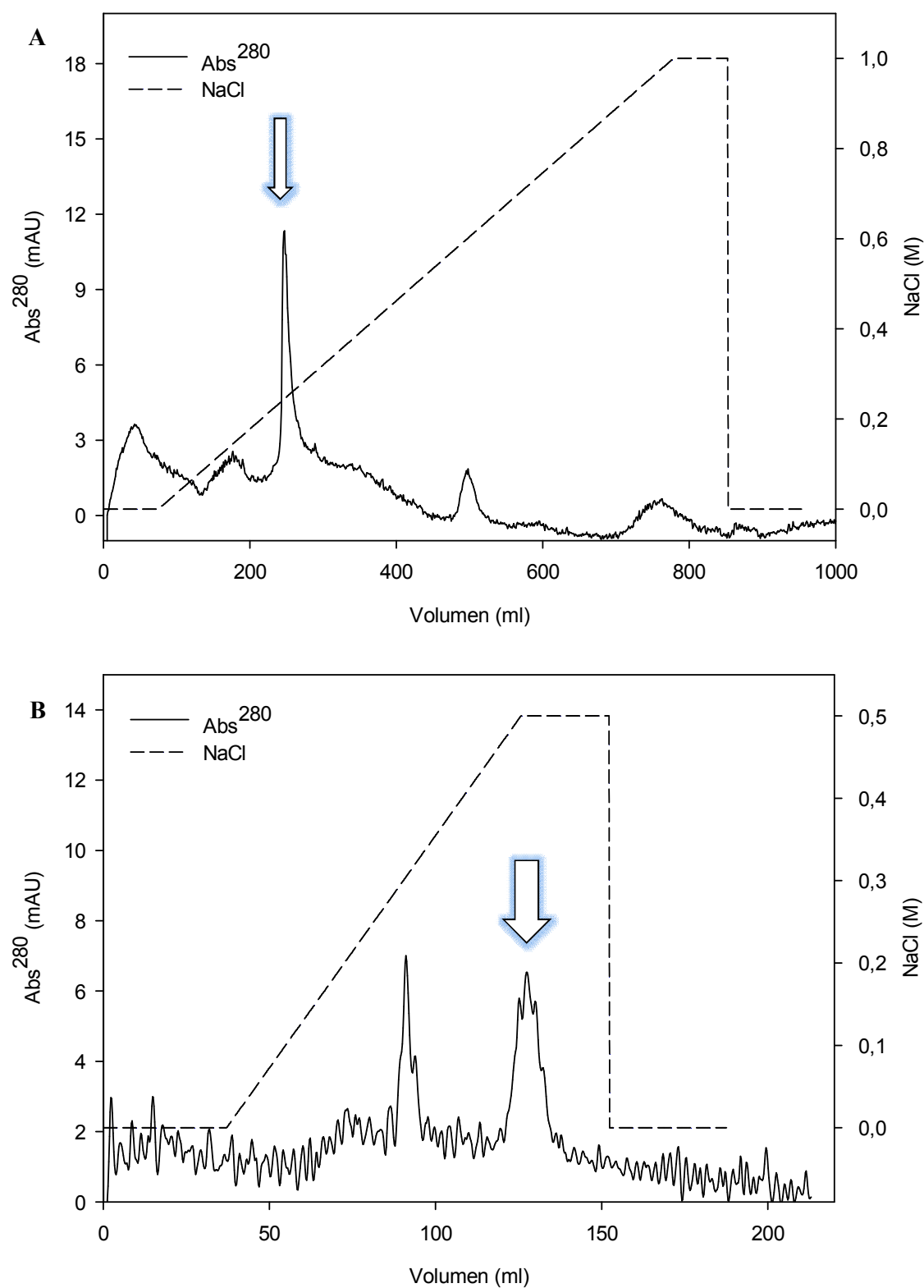


Figura 3.3. Cromatogramas correspondientes a las cromatografías de intercambio iónico. (A) Intercambiador aniónico (Q Sepharose). (B) Intercambiador catiónico (SP Sepharose).

separación exitosa de dicha actividad en la fracción purificada. El análisis mediante IEF y SDS-PAGE de la fracción sometida al proceso completo de purificación reveló una única banda homogénea, la cual exhibió actividad frente a APG según puede observarse en la zimografía (Fig. 3.4).

Durante el protocolo completo de purificación cromatográfica se constató que la adsorción de los pigmentos del extracto crudo a los rellenos de las columnas utilizadas es un fenómeno con un alto grado de inespecificidad, ya que resultó prácticamente independiente de la naturaleza de la resina. Esto conllevó a que la fracción positiva para actividad PGasa fuera perdiendo el color paulatinamente conforme se pasaba de una cromatografía a la siguiente. Finalmente, resulta importante mencionar que debido a la inespecificidad de unión entre los compuestos coloreados y los distintos tipos de resinas utilizados, el grado de eliminación de color dependió fuertemente de la cantidad inicial de pigmentos y, en consecuencia, del volumen de extracto crudo sometido al proceso de separación cromatográfica.

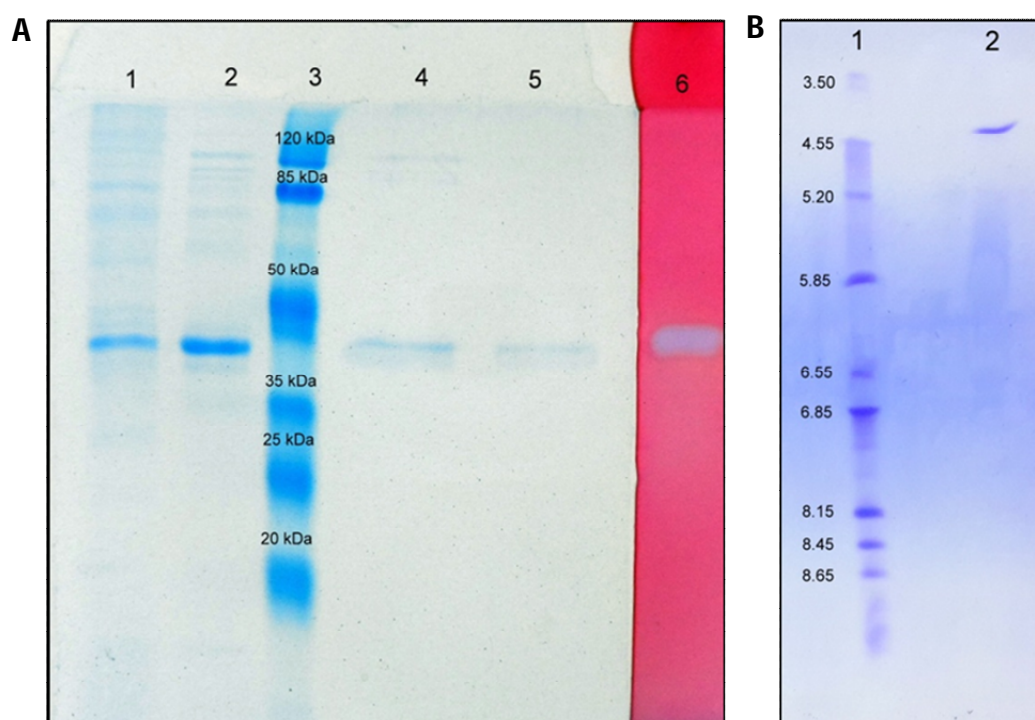


Figura 3.4 (A) Análisis por SDS-PAGE del proceso de purificación de una PGasa de *A. sojiae*. Calle 1: extracto crudo, calle 2: fracción positiva eluída de Q Sepharose, calle 3: marcador de peso molecular, calle 4: fracción positiva eluída de SP Sepharose, calle 5: fracción positiva eluída de Superdex 75, calle 6: zimografía de la fracción positiva eluída de Superdex 75. (B) IEF. Calle 1: marcador de pI, calle 2: PGasa purificada.

Caracterización bioquímica

El peso molecular aparente de la PGasa de *A. sojae* según SDS-PAGE fue de 47 ± 0.9 kDa. En un estudio distinto con *A. sojae* creciendo en cultivos sumergidos, se obtuvieron dos bandas de 36 y 53 kDa en un gel proveniente de un SDS-PAGE sembrado con una fracción parcialmente purificada y positiva para actividad PGasa [Tari et al., 2008]. El hecho de que la diferencia de tamaño entre la banda de 53 kDa y la presentada en el presente capítulo, ambas activas frente a APG, sea pequeña sugiere que podría tratarse de la misma proteína. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los hongos filamentosos pueden sintetizar y secretar al medio de cultivo más de una proteína con actividad PGasa [Dinu et al., 2007; Semenova et al., 2003; Byrne, 2017], hecho que está íntimamente relacionado con su capacidad para degradar y metabolizar pectina. El peso molecular reportado de PGasas secretadas por una amplia variedad de microorganismos tales como *Fusarium graminearum* [Ortega et al., 2014], *Saccharomyces cerevisiae* [Gainvors et al., 2000] o *Streptomyces lydicus* [Jacob et al., 2008] es de 40, 42 y 43, kDa, respectivamente, por lo que varían dentro del valor encontrado en el presente estudio.

Al ser sometida a un IEF, la proteína purificada enfocó a un valor de pI aproximado de 4.2 (Fig. 3.4 B), el cual es un valor algo menor que la media de los valores reportados de la mayoría de las PGasas [Jayani et al., 2005], pero que de todos modos se encuentra dentro de los valores normales para estas enzimas.

La mayoría de las enzimas industriales utilizadas actualmente son de acción hidrolítica y se emplean para degradar varias sustancias naturales. Dentro de las enzimas hidrolíticas, las carbohidrasas representan el segundo grupo en importancia [Kirk et al., 2002], el cual comprende principalmente amilasas, celulasas y pectinasas. Cuando se plantea la utilización de una o varias enzimas en un proceso industrial dado, la estabilidad es un factor importante a ser tenido en cuenta. La temperatura y el pH en el que se lleva a cabo el proceso así como la presencia de iones metálicos tienden a afectar la actividad y estabilidad del biocatalizador. Para ejemplificar, las pectinasas que se adicionan al jugo de manzana para su clarificación deben ser estables y activas bajo condiciones ácidas debido al pH inherente del jugo y a que éste clarifica mejor a pH ácido [Kashyap et al., 2001].

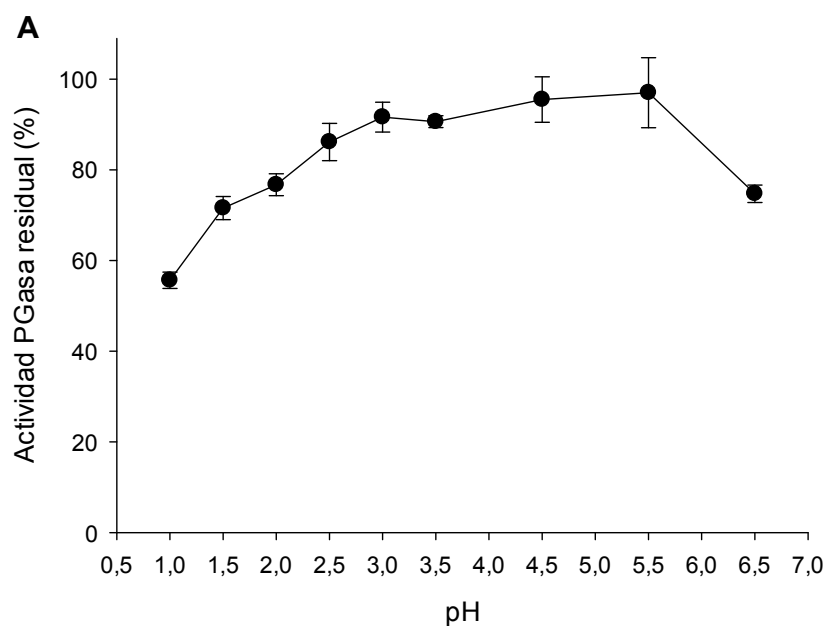
La estabilidad de la PGasa de *A. sojae* se estudió en un rango de pH de 1.0-6.5. Luego de 2 horas de incubación, la enzima purificada retuvo más del 75 % de

su actividad inicial entre pH 2.0 y 6.5, y exhibió un 55 % de actividad residual en un intervalo de pH muy bajo (1.0-2.0) (Fig. 3.5 A). Para ahondar aún más en esta propiedad de tolerancia en un entorno de fuerte acidez, la enzima purificada se incubó durante 24 horas en el rango de pH 1.0-3.0, mostrando una retención del 35 % de su actividad inicial a pH 1.0 y más de un 75 % desde pH 1.5 en adelante (Tabla 3.2). Si bien las PGasas fúngicas tienden a ser estables a pH ácido, rara vez suele estudiarse esta propiedad a valores de pH menores a 2.

Tabla 3.2. Estabilidad de la PGasa purificada luego de 24 horas de incubación en condiciones de acidez fuerte

pH	Actividad residual (%) ^a
1.0	35.4 ± 0.9
1.5	76.2 ± 1.8
2.0	84.8 ± 1.4
2.5	79.3 ± 0.8
3.0	86.7 ± 1.3

^a Porcentajes expresados respecto de la condición de máxima estabilidad (pH 5.0).



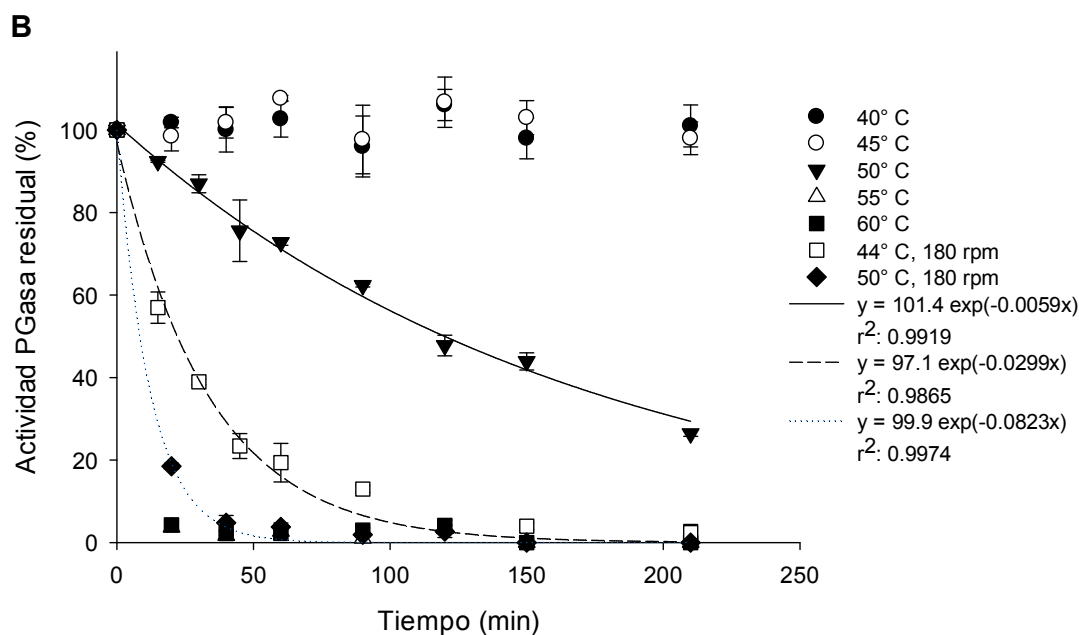


Figura 3.5. Influencia del pH (A) y de la temperatura (B) en la estabilidad de la PGasa purificada de *A. sojae*.

La PGasa purificada se incubó a diferentes temperaturas (40 a 60° C) con el fin de evaluar su resistencia a la desnaturalización térmica. Hasta 45° C la enzima se mostró completamente termoestable, mientras que retuvo un 25 % de su actividad luego de incubación por 210 minutos a 50° C; la inactivación térmica de la enzima a esta última temperatura se ajustó satisfactoriamente a una cinética de primer orden bajo la cual se calculó una vida media cercana a 2 horas (Fig 3.5 B). En comparación, la vida media de otras PGasas purificadas de *A. giganteus*, *Trichoderma harzianum* y *Penicillium viridicatum* a 50° C fueron reportadas como 18, 30 y 60 minutos, respectivamente [Pedrolli & Carmona, 2010; Mohamed et al., 2006; Silva et al., 2007], mientras que la PGasa aislada del hongo termófilo *Thermoascus aurantiacus* probó ser completamente termoestable frente a 1 hora de incubación a 50° C y exhibió una vida media a 60° C de 10 minutos [Martins et al., 2007]. Las características de estabilidad térmica de la PGasa de *A. sojae* permiten concluir que sería un candidato potencial para aplicaciones relacionadas con el procesamiento de jugos de fruta. Para la fabricación de jugo de manzana, el tiempo de clarificación enzimática del jugo depende en parte de la temperatura del proceso, la cual a su vez se encuentra limitada por la tolerancia térmica del biocatalizador. El hecho de que el proceso de clarificación puede llegar a reducirse a 1 hora si se desarrolla a 50° C [Lea, 1995], y de que la PGasa purificada presenta una vida media de 2 horas a 50° C,

hace que la enzima sea adecuada para dicho propósito. En este contexto, vale la pena mencionar que al ensayar la actividad PGasa de la enzima purificada a 50° C, ésta fue 2.3 veces más eficiente contrastando con las condiciones estándar de ensayo (35° C). Siguiendo la misma línea de discusión, cabe destacar también que la estabilidad térmica de la PGasa purificada disminuye sensiblemente a si la misma es incubada en un baño que a su vez se encuentra en agitación. Más precisamente, la incubación a 44° C y 180 rpm se tradujo en una inactivación con cinética de orden uno, a partir de la cual se calculó una vida media de 22 minutos; a su vez, la vida media calculada para la incubación a 50° C y 180 rpm disminuyó a 8.5 minutos (Fig. 3.5 B). Se desprende de estos hallazgos la utilidad de la PGasa de *A. sojae* en procesos fundamentalmente estáticos y la necesidad de realizar un análisis previo de factibilidad en procesos que se llevasen a cabo en condiciones de agitación térmica y mecánica tales que pudieran inactivar al biocatalizador.

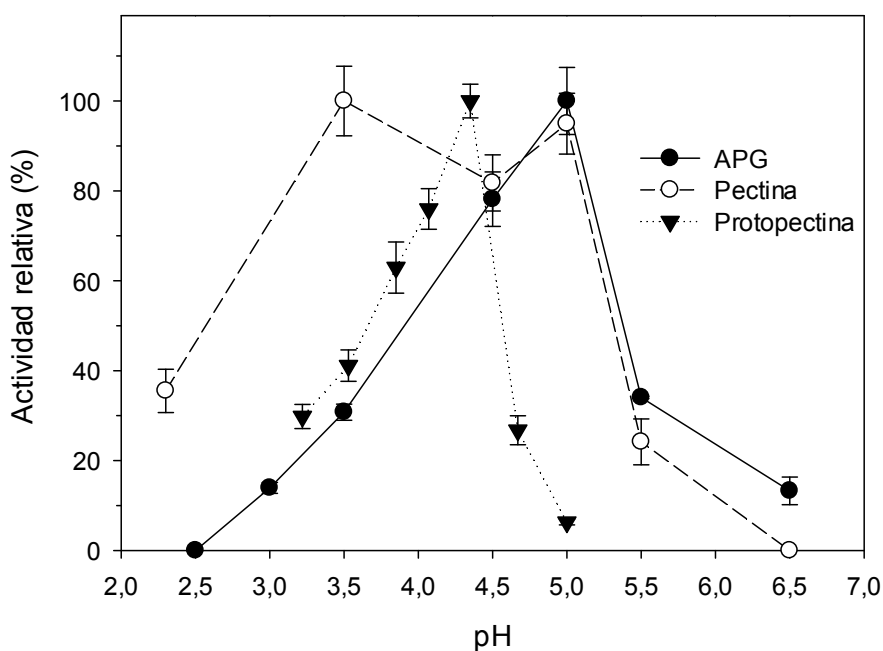


Figura 3.6. Influencia del pH en la actividad de la PGasa purificada de *A. sojae* frente al APG, pectina y protopectina. Las barras de error representan el desvío estándar de la media, calculado con tres réplicas.

La PGasa purificada exhibió actividad catalítica frente a APG, pectina cítrica, y protopectina de limón, siendo el rango de pH para actividad óptima dependiente del tipo de sustrato (Fig. 3.6). Para APG se observó actividad óptima

a pH 5.0, mientras que con protopectina como sustrato la enzima actuó mejor a pH 4.3; en lo que respecta a la pectina, fue hidrolizada más eficientemente a pH 3.5, si bien la enzima aún trabajaba al 35 % de su actividad óptima a pH 2.3. Esta dependencia en la actividad óptima con el sustrato ensayado fue reportada previamente por Contreras-Esquivel & Voget [2004] para una endo-PGasa purificada a partir de sobrenadantes de cultivo de *A. kawachii*, la cual trabajaba sobre protopectina en condiciones óptimas a pH 2.0, mientras que en la misma condición de acidez su actividad catalítica frente a APG descendía al 10 %. Los estudios de la influencia del pH en la actividad frente a sustancias pécticas diferentes pueden resultar útiles para predecir condiciones apropiadas para diferentes aplicaciones industriales; por ejemplo, en la maceración enzimática de tejidos vegetales se debe asegurar una degradación limitada de pectina junto con una elevada actividad solubilizadora de pectina, mientras que en los procesos de extracción y clarificación de jugos se persigue una destrucción completa de las sustancias pécticas [Kashyap et al., 2001].

Tabla 3.3. Especificidad de sustrato de la PGasa de *A. sojae*

Sustrato	Actividad enzimática (%) ^b
Ácido poligalacturónico, APG	100
Pectina de manzanas (GE ^a = 50.0 ± 0.7 %)	37
Pectina cítrica (GE = 63.3 ± 0.9 %)	17
Protopectina de limón	2

^a GE: grado de esterificación, valores expresados como la media de tres determinaciones ± desvío estándar.

^b Determinaciones realizadas a pH 4.5 y expresadas como porcentaje respecto al valor máximo.

Si bien la actividad relativa sobre cada uno de los sustratos depende, como se explicó anteriormente, del pH de la solución, considerando un pH de 4.5 – valor al cual la PGasa cataliza más eficientemente la hidrólisis de todos los sustratos- puede establecerse la siguiente relación aproximada entre actividades frente a APG, pectina cítrica y protopectina: 1/ 0.17 / 0.02. Debido a que el 93.5 % de la pectina cítrica utilizada corresponde a AGA (según fabricante) - y por ende, mayoritariamente a homogalacturonano-, el 17 % de actividad catalítica frente a

pectina cítrica en relación a APG da cuenta de la preferencia de la enzima por poligalacturonanos no esterificados. Para ahondar en este aspecto, se determinó el GE de la pectina cítrica así como de una pectina proveniente de manzanas, y se midió además la actividad PGasa frente a esta última. La enzima hidrolizó con el doble de eficiencia la pectina de manzanas, cuyo GE fue del $50.0 \pm 0.7 \%$, respecto a la pectina cítrica, con GE de $63.3 \pm 0.9 \%$. Estos resultados se resumen en la Tabla 3.3. La alta afinidad relativa de la PGasa de *A. sojae* frente al APG, cuyos grupos carboxílicos no se encuentran esterificados, es una propiedad común a la mayoría de las PGasas reportadas hasta la fecha, las cuales hidrolizan las regiones no esterificadas o pobremente esterificadas de la pectina.

Como se explicó anteriormente, la actividad relativa de la PGasa purificada frente a APG desciende considerablemente a pH 6.5 (Fig. 3.6), mientras que Tari et al. [2008] reportaron que una PGasa de *A. sojae* caracterizada utilizando un extracto crudo proveniente de cultivos con glucosa y maltrina presentaba un 80 % de actividad relativa a pH 7.0, concluyendo entonces que se trata de dos PGasas diferentes e indicando que *A. sojae* produciría diferentes PGasas –de carácter constitutivo e inducible- dependiendo de la naturaleza de la fuente de carbono utilizada. La expresión diferencial de PGasas según la fuente de carbono se estudió en *A. kawachii*: este hongo filamentoso produce y secreta al menos tres PGasas diferentes cuya proporción relativa varía en forma notoria si el microorganismo se hace crecer en medios de cultivo sumergidos con glucosa respecto de pomaza de limón como sustrato [Vita et al., 2009; Byrne et al., 2017].

Se ensayó el efecto de algunos cationes así como de otros agentes químicos en la actividad de la PGasa purificada, partiendo de la existencia de estudios en los que se reporta la estimulación de la actividad de PGasas fúngicas y bacterianas por iones metálicos [Jacob et al., 2008; Pedrolli & Carmona, 2010]. Sin embargo en el presente estudio, mientras que en presencia de Mg^{2+} y Zn^{2+} la actividad enzimática disminuyó un 8 y 12 % respectivamente, los cationes Ca^{2+} y K^{+} no modificaron sensiblemente la catálisis (Tabla 3.4). En sintonía con estos resultados, no se observó inhibición alguna en presencia una solución 5 mM de EDTA, lo cual sugiere que la actividad enzimática aparentemente no depende de cationes. A la inversa, la enzima purificada perdió completamente su actividad cuando fue incubada junto con Hg^{2+} que, conocido por actuar como un agente bloqueante de grupos tiol, indica que ciertos residuos de cisteína estarían involucrados en la unión de la enzima al sustrato o en el proceso catalítico en sí mismo. Por otro lado, la actividad PGasa no se vio afectada por β -mercaptoetanol

por lo que se sugiere que la estructura terciaria de la proteína no presenta puentes disulfuro, o bien que éstos no se encuentran lo suficientemente accesibles al agente reductor. Además, ni la incubación con etanol al 15% (v/v) ni con una solución 100 mg/L de SO₂ alteraron la actividad de la enzima purificada, lo cual permite su aplicación durante la elaboración de vinos en donde se utiliza normalmente SO₂ para inhibir el desarrollo de bacterias y levaduras no deseadas a la vez que protege al vino de reacciones de oxidación.

Tabla 3.4. Efecto de varios compuestos químicos sobre la actividad de la PGasa purificada

Compuesto químico	Concentración	Actividad PGasa residual (%)
Mg ²⁺	1 mM	93.5 ± 3.5
Zn ²⁺	1 mM	96.0 ± 4.6
Ca ²⁺	1 mM	91.5 ± 2.2
K ⁺	1 mM	96.8 ± 8.2
Hg ²⁺	1 mM	0.0 ± 0.0
EDTA	5 mM	98.3 ± 3.6
β-mercaptoetanol	2 mM	96.6 ± 4.2
Etanol	15 % (v/v)	104.3 ± 5.1
Metanol	15 % (v/v)	106.3 ± 10.9
SO ₂	100 mg/L	99.5 ± 2.5

Valores expresados como la media de tres determinaciones ± desvío estándar.

Modo de acción

El análisis por CCF de los productos de hidrólisis del APG permite observar que durante la primer parte de la reacción catalizada por la PGasa se liberaron oligogalacturonatos, así como di- y fundamentalmente tri-galacturonatos (Fig. 3.7 B). Pasadas 6 horas de incubación los oligogalacturonatos fueron completamente degradados, resultando el tri-galacturonato como el producto final de reacción, lo cual es consistente con el 34 % de hidrólisis obtenido (Fig. 3.7 A). Estos resultados permiten clasificar a la PGasa purificada como una endo-PGasa (EC 3.2.1.15). Entre los productos finales de reacción también se observaron, aunque en cantidades menores, mono- y di-galacturonatos, produciéndose el AGA en la etapa final de la reacción.

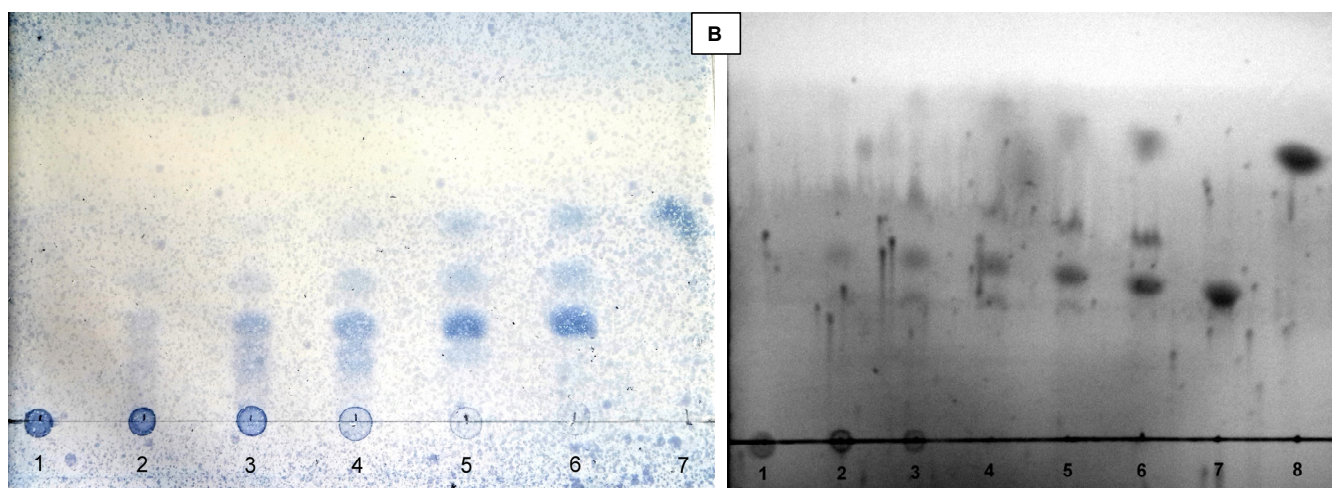
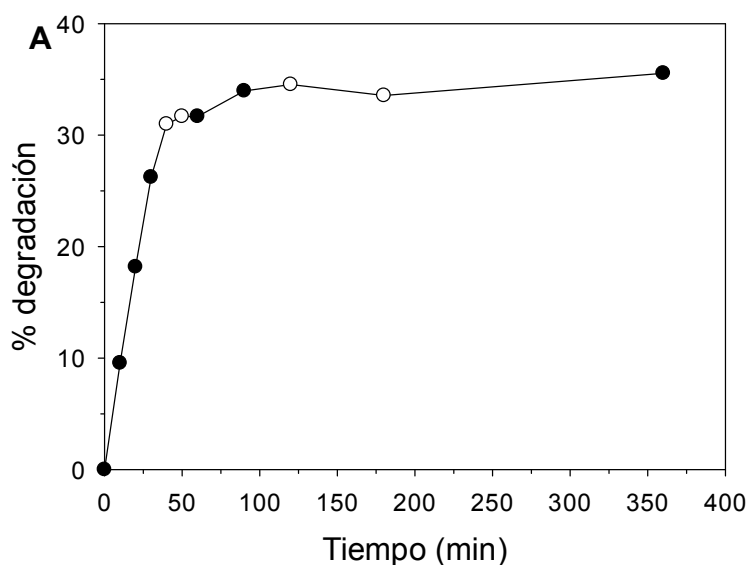


Figura 3.7. (A) Curso temporal de la hidrólisis de APG catalizada por la PGasa de *A. sojae*. Los puntos negros indican aquellas muestras sometidas a análisis por CCF. (B) CCF con los productos de hidrólisis de APG por la PGasa de *A. sojae*, obtenidos luego de 0, 10, 20, 30, 60 y 360 min de reacción (calles 1 a 6, respectivamente). IZQ: Revelado por rociado; calle 7: patrón de AGA. DER: Revelado por inmersión; calle 7: patrón de ácido tri-galacturónico, calle 8: patrón de AGA.

El patrón de degradación exhibido por la endo-PGasa de *A. sojae* sugiere que la enzima corta al sustrato en forma aleatoria pero no procesiva; en lugar de eso, ocurrirían varios eventos de hidrólisis en forma aleatoria, finalizando con la disociación de la enzima de su molécula diana y la subsecuente formación de un nuevo complejo enzima-sustrato con otra cadena del polímero [Benen et al., 1999]. A su vez, la endo-PGasa no fue capaz de hidrolizar trimeros, por lo que éstos se acumularon al final de la reacción. Es probable que la formación de AGA

y di-galacturonato se haya originado por eventos ocasionales y azarosos de hidrólisis en el primer o segundo enlace glicosídico, cuya frecuencia incrementa – en especial el clivaje del enlace terminal- a medida que el tamaño del oligómero transitorio disminuye. Este patrón de clivaje de la endo-PGasa de *A. sojae*, descrito por Cook et al. [1999] como patrón endo clásico, se asemeja al utilizado para describir el modo de acción de la endo-PGasa II de *A. niger* N400 [Benen et al., 1999], pero difiere del modo de acción endo/exo de la endo-PGasa I de *A. kawachii* mediante el cual los mono-, di- y tri-galacturonatos se generan a tiempos muy cortos de reacción [Contreras-Esquivel, 2003; Contreras-Esquivel & Voget, 2004].

Características cinéticas

La cinética de hidrólisis de APG se describió satisfactoriamente mediante una cinética tipo Michaelis-Menten, como puede observarse en la Fig. 3.8 A. Obsérvese que una concentración inicial de APG de 1.8 g/L en la mezcla de reacción (valor utilizado en los ensayos de determinación de actividad PGasa a lo largo de este trabajo) puede considerarse con seguridad como saturante para la endo-PGasa de *A. sojae* ya que la velocidad de reacción, representada como unidades de actividad enzimática, es en estas condiciones la máxima alcanzada.

Las constantes cinéticas K_M and V_{MAX} , determinadas a pH 5.0 y 35° C y calculadas por medio de la gráfica de Hanes-Hultin, fueron 0.13 mg/ml y 9.6 $\mu\text{mol/mg.min}$, respectivamente (Fig. 3.8 B). Este valor de K_M frente a APG se encuentra entre los más bajos reportados de PGasas purificadas [Gummadi & Panda, 2003; Jayani et al., 2005; Niture, 2008], lo cual da cuenta de la elevada afinidad de la PGasa de *A. sojae* por su sustrato. En lo que concierne a este autor, sólo se reportaron dos PGasas fúngicas purificadas cuyos valores de K_M sobre APG son menores al determinado en el presente trabajo: una PGasa sintetizada por *Fusarium moliniforme* ($K_M = 0.12 \text{ mg/ml}$) [Niture et al., 2001] y otra producida por una cepa de la levadura *Kluyveromyces marxianus* ($K_M = 0.03 \text{ mg/ml}$) [Serrat et al., 2002]. El número de recambio (k_{cat}) y la constante de especificidad (k_{cat}/K_M) de la PGasa de *A. sojae* fueron 7.5 /s y 56 ml/mg.s, respectivamente.

Tabla 3.5. Constantes cinéticas de PGasas fúngicas purificadas

Microorganismo	k_{cat} (1/s)	K_M^a (mg/ml)	Constante de especificidad, k_{cat}/K_M (ml/mg.s)	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	1954.3	0.94	2079.0	Dinu et al., 2007
<i>Aspergillus japonicus</i>	90 ^b	1.03	87.4	Semenova et al., 2003
	26 ^b	0.35	74.3	
<i>Fusarium moliniforme</i> ^c	70	0.12	583.3	Niture et al., 2001
<i>Fusarium moliniforme</i> ^c	104.0	0.16	650	Bonnin et al., 2001
<i>Trichoderma harzianum</i>	592	3.4	174.1	Mohamed et al., 2006
<i>Rhizopus oryzae</i>	2230	2.7	825.9	Yadav et al., 2011
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1.83	0.03	61.0	Serrat et al., 2002
<i>Aspergillus sojae</i>	7.5	0.13	56.0	Este trabajo

^a Sustrato: APG^b PGasas diferentes de la misma cepa^c Cepas diferentes

Tal como puede verse en la Tabla 3.5, existe una amplia variación en la magnitud de los valores de constantes de especificidad de diferentes PGasas purificadas [Dinu et al., 2007; Semenova et al., 2003; Niture et al., 2001; Mohamed et al., 2006]; sin embargo al comparar, la constante de especificidad de la PGasa de *A. sojae* es de las más bajas. En principio, a partir de estos datos se podría tender a pensar que la eficiencia catalítica de la PGasa de *A. sojae* es significativamente menor que la de otras PGasas previamente caracterizadas y que, por ende, sería un biocatalizador poco atractivo para fines prácticos. Sin embargo, es importante resaltar que la constante k_{cat}/K_M , útil y fiable para comparar la velocidad de catálisis de una enzima en particular frente a dos sustratos diferentes, resulta ser un índice defectuoso si se utiliza para comparar diferentes enzimas que catalizan una misma reacción. Esto es debido a que la relación de velocidades -es decir, qué reacción es catalizada más rápidamente- obtenida por dos enzimas diferentes con idénticos valores de k_{cat}/K_M depende del cociente [sustrato]/ K_M [Eisenthal et al., 2007]; por lo tanto, cada caso debe cotejarse cuidadosamente, poniendo atención en las condiciones en las que estos índices fueron determinados (especialmente la temperatura).

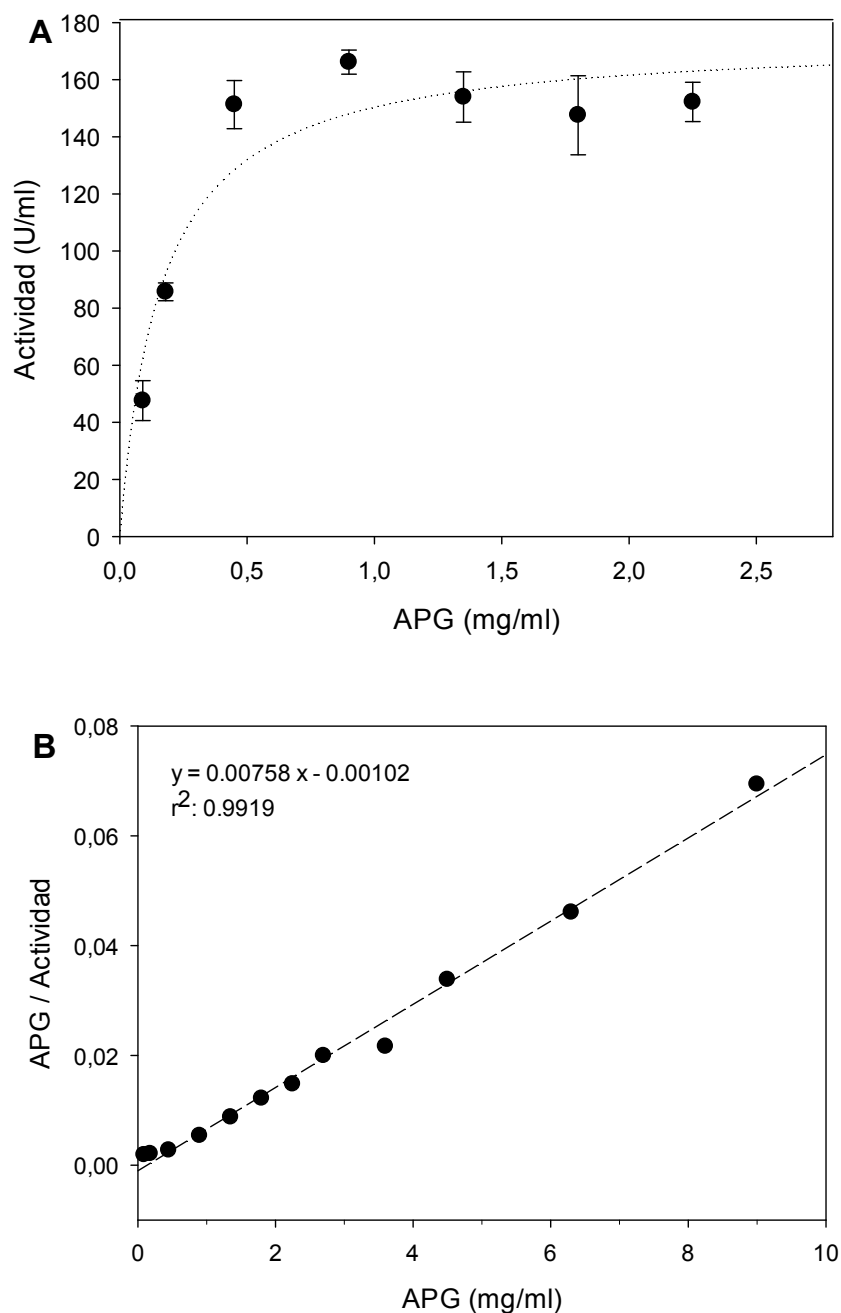
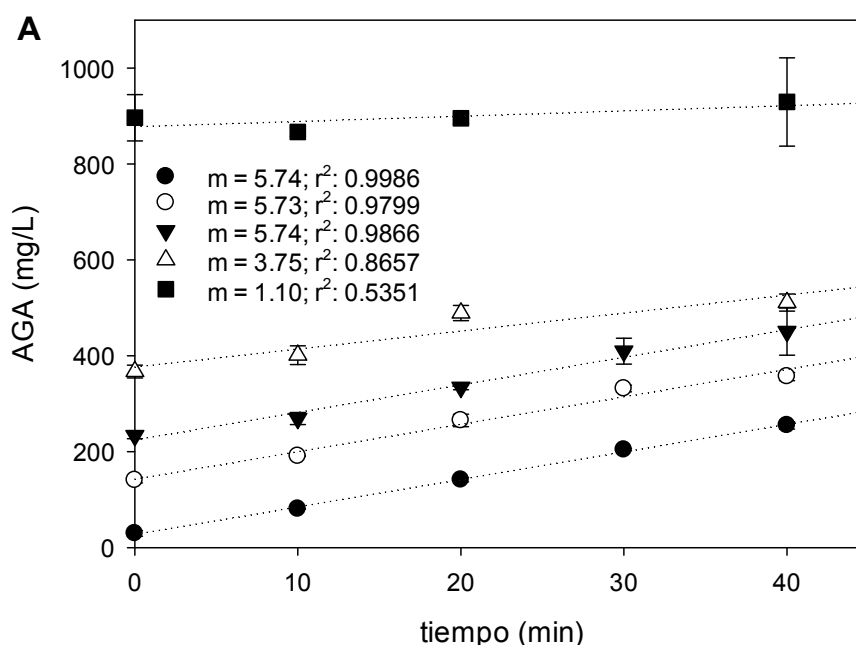


Figura 3.8 (A) Gráfico de Michaelis-Menten. Las barras de error representan el desvío estándar de la media graficada, calculado con cinco réplicas. (B) Gráfico de Hanes-Hultin, a partir del cual se calcularon los valores de K_M y V_{MAX} .

La existencia de un posible efecto inhibitorio de los productos finales de degradación de APG se evaluó siguiendo el curso temporal del incremento de los grupos reductores al incubar a la PGasa purificada junto con APG y con cantidades diferentes de productos finales de reacción. La inhibición se constató al observar no era posible obtener gráficos lineales de progresión de la reacción

catalítica cuando la concentración inicial de productos finales en la mezcla de reacción era mayor un valor aproximado de 350 mg/L de grupos reductores (Fig. 3.9 A). A través del gráfico de Dixon se constató que el efecto inhibitorio era de carácter competitivo, debido a que las rectas se intersecan en el segundo cuadrante de dicho gráfico (Fig. 3.9 B). La inhibición de carácter mixta se descartó al observar que a concentraciones mayores de APG la velocidad de reacción no se veía alterada por la concentración del inhibidor por hallarse la PGasa saturada con su sustrato y en consecuencia, no inhibida; en el gráfico de Dixon dicho efecto se observa como valores que describen una recta paralela al eje de las abscisas (Fig. 3.9 B, con APG 1.0 mg/ml).

El valor constante de inhibición, k_I , fue de 0.6 mM, y está expresado en función del tri-galacturonato, por ser el producto de hidrólisis mayoritario. El único reporte de constantes de inhibición por producto final para endo-PGasas en bibliografía es el determinado por Mertens & Bowman [2016], siendo 0.767 mM para la inhibición competitiva ejercida por di-galacturonato sobre una endo-PGasa de *Rizophus oryzae*. A su vez, se reportó la inhibición por producto final en dos exo-PGasas del microorganismo antes citado, las cuales fueron inhibidas en forma competitiva por AGA, con valores de k_I de 0.886 y 0.501 mM [Kester et al., 1996].



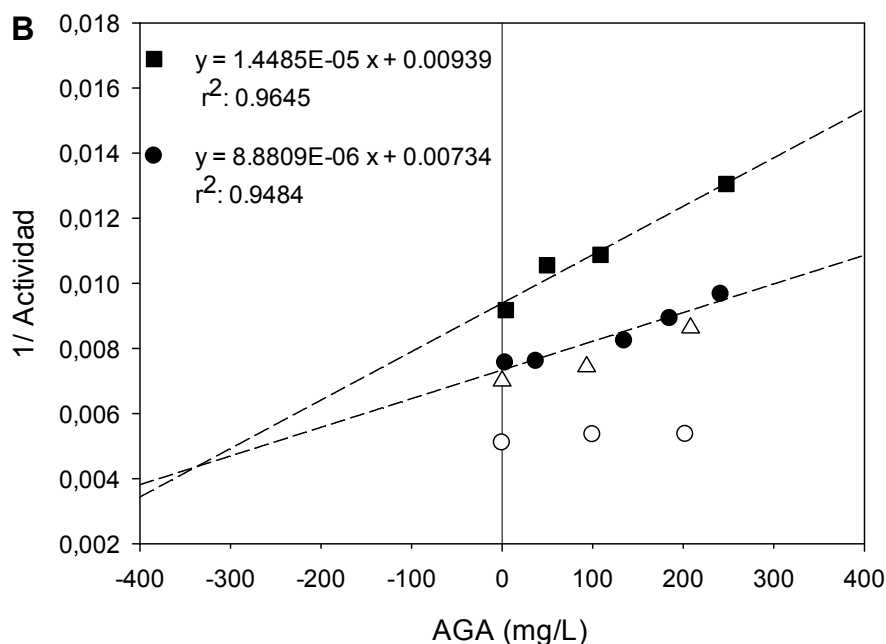


Figura 3.9 (A) Progresión de la reacción de formación de azúcares reductores a partir de APG, catalizada por la PGasa de *A. sojae*, en presencia de distintas cantidades iniciales de productos finales de reacción. A tiempo = 0, el valor de azúcares reductores da cuenta de la concentración inicial de productos finales para cada reacción. Las barras de error representan el desvío estándar de la media graficada, calculado con tres réplicas.

(B) Gráfica de Dixon utilizada para calcular la constante de inhibición, k_i , por productos finales de hidrólisis de APG. Para dicha estimación se utilizaron los valores obtenidos con dos concentraciones de sustrato: (■) 0.3750 y (●) 0.4375 mg/mL. A su vez, se muestran graficados los valores obtenidos con (△) 0.5000 y (○) 1.000 mg/mL de APG. Cada conjunto de puntos se obtuvo de determinaciones de actividad PGasa en presencia de cantidades crecientes de productos finales de reacción, expresados como AGA. Los valores representados corresponden a la media de tres determinaciones.

Conclusiones

Empleando una serie de pasos cromatográficos con resinas de intercambio iónico y de exclusión molecular se consiguió purificar a homogeneidad, por primera vez, una PGasa de *A. sojae* ATCC 20235, desde el sobrenadante de cultivos realizados con cáscara de naranja como fuente de carbono y energía. El rendimiento total del proceso fue de 42.6 % con un aumento en la actividad específica de 15.2 veces.

El análisis de los productos de degradación de APG mediante CCF permitió determinar el carácter endo- de la enzima, concluyendo es una endo-PGasa. Algunas de sus propiedades, como su peso molecular (47 kDa) y su pI (4.2), se encuentran dentro del rango normal de valores reportados para estas enzimas. Asimismo, su perfil de estabilidad frente a la temperatura y el rango de pH en el que la endo-PGasa es catalíticamente activa son típicos de otras PGasas fúngicas. Por otra parte, los resultados indican que la endo-PGasa no requiere de la presencia de cationes divalentes para catalizar la hidrólisis de su sustrato, y que es completamente inhibida por Hg^{2+} . Las características más sobresalientes de la enzima resultaron ser su amplia estabilidad al pH en condiciones desde neutras hasta muy ácidas, llegando a valores de acidez de 1.0 unidades de pH, así como su valor de K_M frente a APG, el cual es uno de los más bajos reportados de PGasas hasta la fecha.

En cuanto a su campo de aplicación, una endo-PGasa capaz de degradar pectina entre pH 3.0 y 6.0 a una temperatura de trabajo de hasta 45° C puede ser empleada en la extracción y clarificación de jugos de fruta, como por ejemplo, manzana y pera, y también puede emplearse para el procesamiento de cítricos. Además, la enzima resulta un candidato atractivo a ser puesta a prueba en procesos de vinificación, en donde las pectinasas se aplican para clarificar el mosto de uva antes de la fermentación alcohólica, y para promover la liberación de materia colorante al vino.

Referencias bibliográficas

- Benen JAE, Kester HCM, Visser J (1999) Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. *Eur J Biochem* **259**:577 – 585.
- Borin MDF, Said S, Fonseca MJV (1996) Purification and biochemical characterization of an extracellular endopolygalacturonase from *Penicillium frequentans*. *J Agric Food Chem* **44**:1616 – 1620.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248 – 254.
- Byrne CE, Cavalitto SF, Voget CE (2017) Purification and characterization of two inducible exopolygalacturonases from *Aspergillus kawachii*. *Biocatal Agric Biotechnol* **10**:38 – 45.

- Camperi SA, Auday RM, del Cañizo AN, Cascone O (1996) Study of variables involved in fungal pectic enzyme fractionation by immobilized metal ion affinity chromatography. *Process Biochem* **31**:81 – 87.
- Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF (1997) Quantification of pectin-releasing activity of protopectinase-SE from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnol Tech* **11**:331 – 334.
- Cavalitto SF, Hours RA, Mignone CF (1999) Quantification of protopectinase SE, an endopolygalacturonase with pectin-releasing activity from *Geotrichum klebahnii*. *Biotechnol Tech* **13**:385 – 390.
- Contreras Esquivel JC (2003) Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus kawachii*. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata.
- Contreras-Esquivel JC, Hours RA, Voget CE, Mignone CF (1999) *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. *J Biosci Bioeng* **88**:48 – 52.
- Contreras-Esquivel JC, Voget CE (2004) Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *J Biotechnol* **110**:21 – 28.
- Cook BJ, Clay RP, Bergmann CW, Albersheim P, Darvill AG (1999) Fungal Polygalacturonases Exhibit Different Substrate Degradation Patterns and Differ in Their Susceptibilities to Polygalacturonase-Inhibiting Proteins. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**:703 – 711.
- Dinu D, Nechifor MT, Stoian G, Costache M, Dinischiotu A (2007) Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *J Biotechnol* **131**:128 – 137.
- Dixon M (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* **55**:170 – 171.
- Edstrom RD, Phaff HJ (1964) Purification and certain properties of pectin trnas-eliminase from *Aspergillus fonsecaeus*. *J Biol Chem* **239**:2403 – 2408.
- Eisenthal R, Danson MJ, Hough DW (2007) Catalytic efficiency and kcat/KM: a useful comparator? *Trends Biotechnol* **25**:247 – 249.
- Fogarty WM, Kelly CT (1983) Pectic enzymes, pp 131–182. In: Fogarty WM (ed) *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science Publishers, London.
- Gainvors A, Nedjaoum N, Gognies S, Muzart M, Nedjma M, Belarbi A (2000) Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGLI-1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **183**:131 – 135.
- Galiotou-Panayotou M, Kapantai M, Kalantzi O (1997) Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**:425 – 429.
- Gummadi SN, Panda T (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. *Process Biochem* **38**:987 – 996.

- Gusakov AV, Markov AV, Grishutin SG, Semenova MV, Kondratyeva EG, Sinitsyn AP (2002) Viscometric Method for Assaying of Total Endodepolymerase Activity of Pectinases. *Biochemistry (Moscow)* **67**:676 – 682.
- Heerd D, Yegin S, Tari C, Fernández-Lahore M (2012) Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state fermentation: A comparative study. *Food Bioprod Process* **90**:102 – 110.
- Hultin E (1967) Statistical calculation of the accuracy of the Michaelis constant from viscosimetric determinations of polymetaphosphatase and dextranase activity. *Acta Chem Scand* **21**:1575 – 1580.
- Jacob N, Asha Poorna C, Prema P (2008) Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresource Technol* **99**:6697 – 6701.
- Jayani RS, Saxena S, Gupta R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem* **40**:2931 – 2944.
- Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technol* **77**:215 – 227.
- Kester H, Kuster-Van-Someren MA, Müller Y, Visser J (1996) Primary structure and characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*. *Eur J Biochem* **240**:738 – 746.
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002) Industrial enzymes application. *Curr Opin Biotechnol* **13**:345 – 351.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage t4. *Nature* **227**:680 – 685.
- Lea AGH (1995) Enzymes in the production of beverages and fruit juices, pp 223-249. In: Tucker GA, Woods LFJ (eds) *Enzymes in Food Processing*. Springer, Boston, MA, USA.
- Malvessi E, da Silveira MM (2004) Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Braz Arch Biol Technol* **47**:693 – 702.
- Martins ES, Silva D, Leite RSR, Gomes E (2007) Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* **91**:291 – 299.
- Mertens JA, Bowman MJ (2016) Kinetic properties of *Rhizopus oryzae* RPG1 endo-polygalacturonase hydrolyzing galacturonic acid oligomers. *Biocatal Agric Biotechnol* **5**:11 – 16.
- Mohamed SA, Farid NM, Hossiny EN, Bassuiny RI (2006) Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. *J Biotechnol* **127**:54 – 64.
- Nelson N (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* **153**:375 – 380.

- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**:255 – 262.
- Niture SK (2008) Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia (Berlin Ger)* **63**:1 – 19.
- Niture SK, Pant A, Kumar AR (2001) Active site characterization of the single endo-polygalacturonase produced by *Fusarium moniliforme* NCIM 1276. *Eur J Biochem* **268**:832 – 840.
- Ortega LM, Kikot GE, Rojas NL, López LMI, Astoreca AL, Alconada TM (2014) Production, characterization, and identification using proteomic tools of a polygalacturonase from *Fusarium graminearum*. *J Basic Microbiol* **54**:S170 – S177.
- Pedrolli DB, Carmona EC (2010) Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**:567 – 573.
- Pedrolli DB, Monteiro AC, Gomes E, Carmona EC (2009) Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnol J* **3**:9 – 18.
- Semenova MV, Grishutin SG, Gusakov AV, Okunev ON, Sinitsyn AP (2003) Isolation and Properties of Pectinases from the Fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry (Moscow)* **68**:559 – 569.
- Serrat M, Bermúdez RC, Gonzáles Villa T (2002) Production, purification and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. *Appl Biochem Biotechnol* **97**:193 – 208.
- Sharma A, Gupta MN (2001) Purification of pectinases by three-phase partitioning. *Biotechnol Lett* **23**:1625 – 1627.
- Silva D, Martins ES, Leite RSR, Da Silva R, Ferreira V, Gomes E (2007) Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. *Process Biochem* **42**:1237 – 1243.
- Singthong J, Cui SW, Ningsanong S, Goff HD (2004) Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. *Carbohydr Polym* **58**:391 – 400.
- Somogyi M (1952) Notes on sugar determination. *J Biol Chem* **195**:19 – 23.
- Tari C, Dogan N, Gogus N (2008) Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. *Food Chem* **111**:824 – 829.
- Vilariño C, Del Giorgio JF, Hours RA, Cascone O (1993) Spectrophotometric Method for Fungal Pectinesterase Activity Determination. *LWT - Food Sci Technol* **26**:107 – 110.
- Vita CE, Contreras Esquivel JC, Voget CE (2009) Pectolytic enzymes of the industrial fungus *Aspergillus kawachii*. *Food Sci Biotechnol* **18**:1365 – 1370.

Yadav S, Yadav PK, Yadav D, Yadav KDS (2009) Pectin lyase: a review. *Process Biochem* **44**:1 – 10.

Capítulo 4

Caracterización y aplicaciones vinícolas de un preparado pectolítico de *Aspergillus sojae* ATCC 20235: clarificación enzimática de mosto de uva blanca para vinificaciones en blanco, y evaluación de la extracción de polifenoles y aminoácidos durante vinificaciones en tinto

Resumen

El presente capítulo comienza con la descripción del proceso de obtención de un preparado pectolítico de *A. sojae* (PP-AS), desde el cultivo del microorganismo a partir de cáscaras de naranja hasta la obtención de una preparación sólida. PP-AS se caracterizó en términos de actividades enzimáticas relevantes para aplicación vinícola y luego se aplicó, por un lado, al mosto de uva blanca previo a la fermentación alcohólica para evaluar la promoción de la clarificación del mismo, y por otro lado, durante la maceración fermentativa en vinificaciones en tinto con el fin de estudiar su efecto en el desarrollo del color del vino y en su composición fenólica y aminoacídica. De todas las actividades enzimáticas cuantificadas bajo condiciones de vinificación (pH 3.50 y 20° C), la actividad PGasa fue previsiblemente la principal, y probó ser estable e inalterable frente al SO₂. También se verificó la existencia de actividad XYLasa, aunque en cantidades menores, y es destacable la ausencia de actividad pectinesterasa, la cual contribuye en la producción indeseable de metanol.

La adición de PP-AS al mosto de uva blanca promovió en un período de tiempo razonable una clarificación efectiva del mismo ya que a diferencia del mosto sin adición exógena de pectinasas, el cual clarificó pobremente, los niveles de turbidez alcanzados fueron los recomendados para asegurar una fermentación alcohólica adecuada sin que el producto final pierda características sensoriales. Finalizada la elaboración de vinos blancos, aquellos elaborados a partir de los mostos clarificados con PP-AS presentaron niveles significativamente mayores que los vinos control de ácido L-málico y significativamente menores de ácido L-láctico, hecho característico de la fermentación maloláctica e indicativo de un metabolismo activo de bacterias ácido lácticas. Este resultado es atribuible a un desfangado eficaz gracias a la adición de enzimas pectolíticas, ya que durante la clarificación la carga microbiana disminuye sensiblemente y los mostos desfangados son menos proclives de sufrir fermentaciones indeseadas.

Respecto a las vinificaciones en tinto, las actividades enzimáticas de PP-AS promovieron una extracción comparativamente más rápida de materia colorante ya que se alcanzó la máxima intensidad de color antes que en los vinos control. Luego de seis meses de almacenamiento en bodega, los vinos elaborados con PP-AS presentaron concentraciones más elevadas de ácidos cumárico, cafeico y

aspártico ($p < 0.05$), sugiriendo una extracción mejorada de los componentes contenidos en las células de la uva.

Introducción

La elaboración de vinos es un proceso de carácter complejo, pero que desde el punto de vista metodológico puede dividirse en cuatro etapas: el procesamiento pre-fermentativo, la fermentación alcohólica, el procesamiento post-fermentativo y el añejamiento [Moreno-Arribas & Polo, 2009]. Fundamentalmente en las primeras dos etapas de la elaboración de vinos, y en menor medida en la etapa post-fermentativa, las enzimas pectolíticas pueden utilizarse con el fin de mejorar diversos aspectos: la extracción de jugo, clarificación, filtración, estabilidad coloidal (evitando la formación de turbidez ulterior en el procesamiento), extracción de aromas [Styger et al., 2011] y, en el caso de las uvas tintas, apuntando a una mejora en la extracción de color [Santos-Buelga & De Freitas, 2009].

Una vez llegado el momento de la vendimia, la uva es transportada entera hacia la bodega en donde comienza el procesamiento pre-fermentativo de la baya, que consiste primeramente en el despallado de la uva, para evitar la extracción de olores herbáceos indeseables, y posteriormente el prensado, el cual conlleva a la ruptura de la piel de la uva y liberación del jugo, dando lugar a un primer evento de macerado. En esta etapa pueden utilizarse preparados pectolíticos para degradar los polisacáridos presentes en las paredes celulares y láminas medias, y así facilitar la extracción de jugo y liberación de polifenoles (pigmentos, taninos) y precursores de aromas localizados en las células de la piel de la uva [Busse-Valverde et al., 2009]. Un modelo basado en una compilación de resultados de estudios de las paredes celulares de la uva incluye tres tipos principales (Fig. 4.1): una pared celular rica en hemicelulosa, correspondiente a las células periféricas de la piel; una pared celular rica en pectina de la capa interna de células de la piel, con polisacáridos altamente ramificados, y finalmente una pared celular rica en pectina de las células de la pulpa de la baya [Gao et al., 2016]. La parte de la pulpa es fácilmente prensada y da lugar a la liberación de sus componentes, mientras que la zona periférica de las células de la piel es la más difícil de extraer [Conde et al., 2007], y precisa de presión adicional para liberar sus componentes o de la adición de preparaciones pectolíticas, que a su

vez pueden resaltar características propias del varietal y le otorgarle una impronta característica al mosto y al vino.

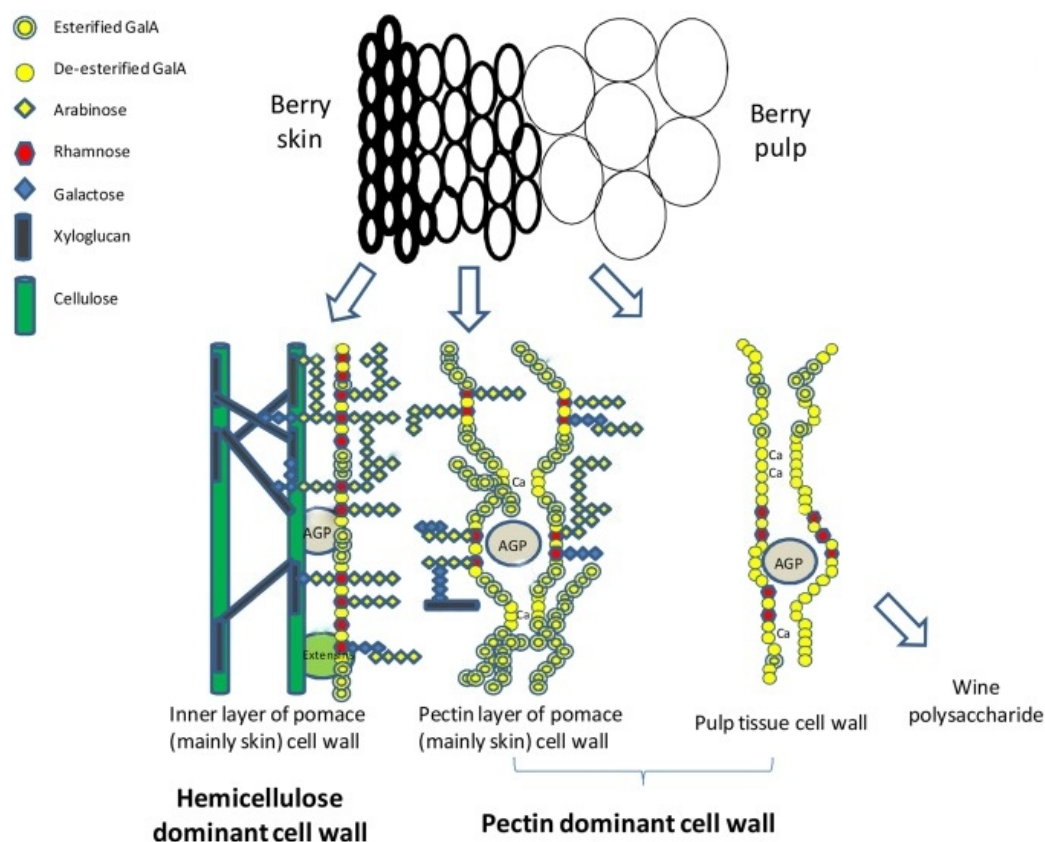


Figura 4.1. Modelo diagramático propuesto de la composición de las paredes celulares de la uva. Modificado de Gao et al. [2016].

Los preparados pectolíticos comerciales suelen consistir en un cóctel de varias enzimas, encargadas de degradar tejidos vegetales y partículas coloidales generados por los polisacáridos del mosto [Ducasse et al., 2011]. Estas actúan a nivel de los componentes pecto-celulósicos de la pared celular mediante el clivaje parcial de sus polisacáridos estructurales [Zietsman et al., 2015a]. Pueden también llegar a potenciar la expresión de aromas en el vino si contienen glicosidasas específicas que hidrolicen los enlaces entre terpenos volátiles o isoprenoides y los residuos de azúcares, liberando entonces moléculas odoríferas que se encontraban en su forma glicosilada en el interior de las células de la baya. De esta forma, la disrupción de los tejidos vegetales de las uvas puede involucrar la acción de una plétora de actividades enzimáticas, contribuyendo en

forma sinérgica para degradar los polisacáridos estructurales [Zietsman et al., 2015b].

En el caso de la elaboración de vinos tintos, a la piel de la uva tinta se le permite estar presente durante la fermentación alcohólica, y los polifenoles (antocianos y taninos) responsables de las propiedades sensoriales de amargor, astringencia y volumen en boca [Brossaud et al., 2001], son extraídos a medida que el etanol producido durante la fermentación facilita su liberación de las células de la piel. Una versión ideal de un preparado enzimático para uso en fermentaciones para vinos tintos debería contener una combinación óptima de enzimas específicas; sin embargo, debido a la falta de información precisa relacionada con los polímeros de las paredes celulares de la uva que son atacados por estas glicosidasas en el contexto de la vinificación, resulta difícil conocer los sitios específicos blanco a los cuales apuntar y, por ende, saber con certeza cuáles son las enzimas necesarias y en qué cantidad [Gao et al., 2016]. El tratamiento con preparados pectolíticos en vinos tintos para extracción de pigmentos y compuestos fenólicos ha sido objeto de controversia en cuanto a su efectividad. Van-Rensburg & Pretorius [2000] describen en forma cronológica varios estudios en donde el uso de pectinasas para mejorar y/o acelerar la extracción de color durante la maceración/fermentación de uva tinta devuelve resultados tanto favorables como no significativos al comparar con las vinificaciones control de cada ensayo. Estas diferencias pueden atribuirse a la naturaleza diferencial de los preparados pectolíticos y a la presencia de actividades enzimáticas indeseadas presentes en éstos, tales como actividad β -glucosidasa y fenol-esterasa. Sin embargo durante los últimos 15 años un número considerable de estudios diferentes parece reivindicar a los preparados pectolíticos como extractores efectivos de materia colorante en vinos tintos [Revilla y González-San José, 2003; Bautista-Ortín et al., 2005; Romero-Cascales et al., 2008; Romero-Cascales et al., 2012; Martín & Morata de Ambrosini, 2014].

Por otra parte, se denomina vinificación en blanco a la elaboración de vino a partir de uva fresca en la que sólo interviene la parte prensada de la pulpa, es decir una fase líquida sin hollejos. Dado que es la ausencia del contacto con la piel durante la fase alcohólica lo que distingue a la vinificación en blanco de la vinificación en tinto, es posible elaborar vino blanco utilizando uva tinta siempre y cuando la uva sea prensada en condiciones tales que se prevenga que los antocianos presentes en la piel de la uva tinta colorean el mosto [Ribéreau-Gayon

et al., 2006]. En contraposición con los vinos tintos, en donde la extracción de componentes de la uva ocurre fundamentalmente durante el macerado en la fermentación alcohólica, en el caso de la vinificación en blanco la extracción de los componentes de la baya ocurre durante el período comparativamente breve de macerado previo a la fermentación alcohólica. El procesamiento pre-fermentativo para la elaboración de vinos blancos incluye un paso de clarificación, con el fin de remover, en mayor o menor medida, partículas sólidas suspendidas tales como restos de piel de la uva, levaduras provenientes de la baya, residuos celulares, restos de productos aplicados durante el crecimiento de la vid y macromoléculas diversas (lípidos, polisacáridos, compuestos nitrogenados), entre otros, que puedan afectar negativamente ciertas propiedades organolépticas del producto final [Ribéreau-Gayon et al., 2006]. Décadas de observación empírica basada en la degustación del vino blanco permitió establecer una relación entre el grado de clarificación del mosto y las propiedades sensoriales: vinos elaborados a partir de mostos con grandes cantidades de partículas sólidas suspendidas eran percibidos como amargos al sabor y con aromas vegetales, mientras que aquellos elaborados con mostos clarificados contenían un agradable aroma frutado característico del varietal. A partir de diversos análisis se identificaron varios de aquellos compuestos responsables de las características aromáticas del vino, considerados entre los más importantes los alcoholes superiores y los ésteres de ácidos grasos, asociados a aromas herbáceos y frutales o florales, respectivamente; es de destacar también el 3-(metil-tio)-1-propanol, cuya presencia debida a mostos poco clarificados le imparte al vino un olor característico desagradable [Lavigne-Cruège, 1996]. Estas moléculas volátiles son productos del metabolismo de azúcares y aminoácidos presentes en el mosto por parte de las levaduras [Ancín et al., 1996; Lozada et al., 2011]. Si bien existen varios métodos de clarificación de mosto tales como centrifugación, filtración o flotación, el más ampliamente utilizado debido a su sencillez y efectividad es el de decantación natural, conocido también como desfangado. Dependiendo de las facilidades de la bodega, este proceso puede llevarse a cabo a baja temperatura, lo cual puede agilizar el proceso, o a temperatura ambiente y más o menos controlada. Otra forma de acelerar el desfangado es mediante el agregado de preparados pectolíticos exógenos, mediante los cuales además el bodeguero puede mitigar la falta de equipamiento costoso como cámaras o sistemas de refrigeración, así como desligarse de la dependencia de pectinasas naturales de la uva, de presencia irregular. El agregado de pectinasas al mosto modifica la estructura coloidal del

jugo mediante su acción sobre las sustancias pécticas presentes, facilitando una decantación natural.

La endo-PGasa de *A. sojae* demostró ser un catalizador robusto al pH, etanol y SO₂, y exhibió ciertas propiedades, tales como la capacidad de degradar sustancias pécticas a valores de pH coincidentes con aquellos en los que ocurre la elaboración de vinos, con lo cual se ven justificados estudios de aplicación vinícola en pos de la mejora de varios procesos y aspectos. Es por ello que se obtuvo la endo-PGasa de *A. sojae* a modo de preparado pectolítico semi-purificado, se realizaron ensayos de caracterización específicos para aplicación en vinificaciones y se evaluó, por un lado, su capacidad de acelerar el proceso de desfangado de mosto para vino blanco, y por otro, su efecto sobre la extracción de compuestos fenólicos y otros componentes presentes durante la fermentación alcohólica para vino tinto, relacionados con características sensoriales tales como el color.

Materiales y métodos

Reactivos

El APG (sal sódica, AGA = 90 %), pectina de manzanas (AGA \geq 75 %), pectina cítrica de alto GE (\geq 85 %), xilano de madera de abedul (xilosa \geq 90 %) y p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) se adquirieron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, EUA).

Los compuestos cloruro de malvidina, catequina, quercetina y ácido p-cumárico se obtuvieron de Extra synthèse (Lyon, Francia); el ácido gálico de Scharlau (Port Adelaide, SA, Australia) y el ácido cafeico de Fluka (Sigma Chemical Co.). Todos los solventes cromatográficos empleados fueron grado HPLC: el acetonitrilo y metanol se compraron a J. T. Baker (Center Valley, PA, EUA), el dietiléter a Biopack (Zárate, Bs. As., Argentina), el acetato de etilo y ácido fórmico a Anedra (Tigre, Bs. As., Argentina).

Los aminoácidos ácido aspártico, serina, treonina, leucina e isoleucina se adquirieron a Anedra; mientras que la glicina, ácido γ -aminobutírico (GABA), prolina, agmatina, ornitina, espermidina, putrescina, ácido α -aminoadípico, azida de sodio y malonato de dietilo se adquirieron de Sigma. El ácido glutámico, alanina e histamina se obtuvieron de Fluka; la valina y metionina de Merck (Whitehouse Station, NJ, EUA); el triptófano de Biopack y la lisina de Gibco (Rockford IL, EUA).

Preparación del inóculo y obtención del preparado pectolítico

El inóculo semilla se obtuvo a partir de cultivos sólidos en medio agar melaza [Göğüs et al., 2006], procediendo según se indica en el apartado “**Preparación del inóculo**” del capítulo 2. La modalidad de cultivo y el medio de cultivo, así como las condiciones en las que éste se llevó a cabo, fueron similares a las detalladas en el apartado “**Condiciones de cultivo para la producción enzimática**” del capítulo 3. En resumen, el preparado pectolítico se obtuvo por fermentación sumergida de *A. sojae* ATCC 20235 en suspensión acuosa con sulfato de amonio (2.75 g/L) y cáscaras de naranja molidas (40 g/L). La biomasa fúngica y otras partículas sólidas remanentes del cultivo se separaron del medio líquido mediante centrifugación (5900×g, 20 minutos) seguida de filtración con tela muselina. El sobrenadante clarificado se re-filtró pacientemente a través de filtros de membrana de nitrato de celulosa de 47 mm de diámetro con 0.45 µm de tamaño de poro (Sartorius, Goettingen, Alemania) empleando un embudo Büchner conectado a un kitasato con presión negativa, y luego se concentró y lavó con cinco volúmenes de buffer BCP 12.5 mM / 6.25 mM (pH 5.0) mediante diafiltración, por medio de un cassette de filtración tangencial de polietersulfona con un peso molecular de corte de 10 kDa (Sartorius). El concentrado resultante se liofilizó para obtener un preparado sólido, el cual se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Ensayos enzimáticos y determinación de proteínas totales

Las actividades PGasa, xilanasas (XYLasa), endo-glucanasa y celulasa total se ensayaron mediante medida de la liberación de grupos reductores de sus respectivos sustratos, tal como se explica más abajo. Los azúcares reductores liberados a partir de estas actividades enzimáticas se cuantificaron siguiendo la metodología de Somogyi-Nelson [Nelson, 1944; Somogyi, 1952].

Actividad PGasa: se determinó como se detalla en el apartado “**Determinaciones analíticas**” del capítulo 2. Los sustratos utilizados fueron APG y pectina de manzanas; como patrón se empleó AGA.

Actividad XYLasa: se ensayó siguiendo el protocolo correspondiente, indicado en el apartado “**Determinaciones analíticas**” del capítulo 2.

Actividad endo-glucanasa: se siguió el protocolo detallado en el apartado “**Determinaciones analíticas**” del capítulo 2.

Actividad celulasa total: se ensayó en base al protocolo descrito por Ghose [1987], utilizando tiras de papel de filtro (Whatman N°1) sumergidas en buffer BCP (50 mM / 25 mM) y empleando glucosa como patrón. La mezcla de reacción consistió en una tira de papel de filtro de aproximadamente 15 mg sumergida en una solución de 300 µl de buffer y 150 µl de muestra enzimática. Pasados 60 minutos de incubación, los tubos de reacción se enfriaron en un baño de agua-hielo para detener la reacción y proceder con la determinación de grupos reductores.

Actividad pectin-liasa: se determinó como se indica en el apartado “**Ensayos enzimáticos y determinación de proteínas totales**” del capítulo 3.

Actividad pectinesterasa: se ensayó mediante titulación continua con una solución 0.02 M de NaOH de los grupos carboxílicos producidos a partir de una solución acuosa 5 g/L de pectina de alto GE [Velázquez-Estrada et al., 2012]. Un volumen de 6.75 ml de sustrato se incubó durante 10 minutos con 0.75 ml de muestra enzimática, con registro continuo del pH de la solución mediante un electrodo de pH. Una unidad de actividad pectinesterasa se definió como la cantidad de enzima que genera una cantidad de grupos carboxílicos tal que demanda el gasto de 1 µmol de NaOH por minuto para mantener constante el pH de la mezcla de reacción.

Actividad β -glucosidasa: Se determinó siguiente el protocolo detallado en Vita et al. [2009], mediante medida de absorbancia a 405 nm bajo condiciones alcalinas, la cual es proporcional a la liberación de p-nitrofenol ($\epsilon_{405} = 18500/\text{M.cm}$) a partir de pNPG. Brevemente, 180 µl de sustrato 1 mM en buffer BCP (12.5 mM / 6.25 mM) se incubaron junto con 20 µl de muestra enzimática durante 120 minutos. Finalizada la incubación, la reacción se detuvo mediante el agregado de 400 µl de una solución 0.4 M de Na_2CO_3 y se determinó la absorbancia de la solución resultante.

Todos los ensayos de actividad enzimática se realizaron a 20° C y pH 3.50 con el fin de asemejar las condiciones de reacción a aquellas que ocurren normalmente durante la elaboración de vinos. Exceptuando la actividad pectinesterasa, definida más arriba, todas las actividades enzimáticas se definieron como la cantidad de enzima que genera 1 µmol de producto por minuto, a partir de su sustrato.

Proteínas totales: El contenido de proteínas totales se cuantificó por el método de Bradford [1976], utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

Efecto del SO₂ en la actividad PGasa y en la estabilidad enzimática

Se estudió la influencia del SO₂ en la actividad PGasa realizando el ensayo de actividad correspondiente en presencia de diferentes cantidades de SO₂, entre 12.5 y 200 mg/L. Las concentraciones de SO₂ requeridas para los ensayos se obtuvieron a partir de una solución stock 10 % (p/v) de metabisulfito de potasio (KMBS), el cual tiene un rinde un 50 % de SO₂.

Por otro lado, el efecto del SO₂ en la estabilidad de la PGasa se estudió mediante incubación durante 6 días a 20° C en presencia de 200 mg/L de SO₂. Se retiraron alícuotas de la mezcla de incubación a diferentes tiempos, a las cuales se les determinó actividad PGasa bajo condiciones estándar de ensayo.

Desfangado

Se utilizaron uvas blancas variedad Viura, provenientes de *Vitis vinífera* de viñedos locales de la provincia de La Rioja, España. Un total de 65 kg de uvas se despalilló manualmente y posteriormente se sometió a un ciclo de prensado suave (1.67 bar, 60 minutos) por medio de una prensa neumática (Scharfenberger, Bad Dürkheim, Alemania). El mosto resultante se recibió en un depósito de 100 L e inmediatamente después se suplementó con 92 mg/L de KMBS. Los ensayos de desfangado se realizaron en recipientes cilíndricos de vidrio, de 3.8 L de capacidad, con boca amplia y tapa a rosca, e insertada en esta última por medio de una perforación central una válvula tipo “airlock”, permitiendo la salida de gases unidireccional hacia el entorno. El mosto se repartió equitativamente en cada uno de los recipientes, llenados a tope de capacidad, y se realizaron cuatro tratamientos diferentes (Fig. 4.2 A):

- Control, sin el agregado de enzimas (C)
- Agregado del preparado pectolítico de *A. sojae*, PP-AS, en dos cantidades diferentes:
 - 0.020 g / 3.8 L de mosto (AS 1)
 - 0.010 g / 3.8 L de mosto + refuerzo de 0.030 g de PP-AS a las 16 horas, para dar finalmente 0.040 g / 3.8 L de mosto hasta el final del ensayo (AS 2)
- Agregado de Lallzyme C-max, a razón de 0.114 g / 3.8 L de mosto (L).

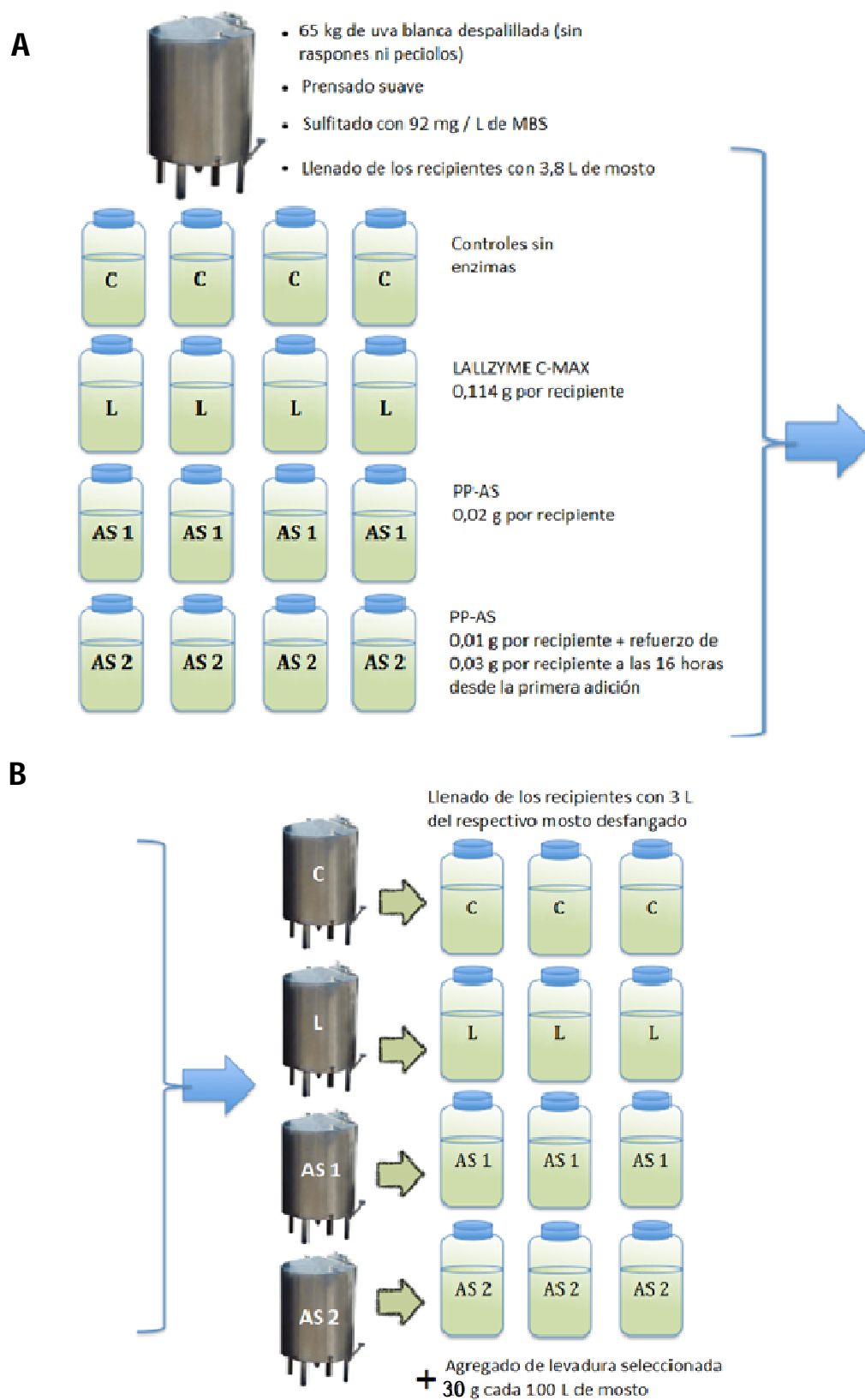


Figura 4.2. Esquema del procedimiento seguido en el desfogado (A) y en las vinificaciones (B).

Lallzyme C-max es un preparado enzimático de Lallemand (Montreal, Canadá), formulado especialmente para clarificación de mostos y vinos, y descrito como de nivel elevado de endo-pectinasas (endo-PGasa y pectin-liasa). El tratamiento con este preparado enzimático se realizó a modo de testigo de ensayo, y las cantidades agregadas, 3 g/hL, corresponden al triple de la dosis recomendada por el fabricante.

Los tratamientos se realizaron por cuadruplicado durante 38 horas en cuartos a temperatura controlada entre 18 y 22° C. El efecto de las enzimas en la clarificación del mosto a lo largo del tratamiento se registró mediante determinaciones periódicas de turbidez utilizando un turbidímetro (Hach 2100N, Derio, España). El índice de turbidez se expresó como NTU (acrónimo en inglés para Unidad de Turbidez Nefelométrica), que se define como el valor correspondiente a la intensidad de la luz desviada por una suspensión estándar de formazina, a un ángulo de 90° con respecto a la radiación incidente. Finalizados los ensayos, el sobrenadante de los recipientes se trasegó en forma separada a cuatro depósitos de 15 L, uno por cada mosto diferente (C, AS 1, AS 2, L), eliminando así las lías presentes en los recipientes.

Vinificaciones en blanco

El mosto producto de los ensayos de desfangado, contenido en cada uno de los cuatro depósitos de 15 L, se repartió de forma tal que el contenido total de cada depósito se vertió cuidadosa y uniformemente en tres recipientes cilíndricos de 3.8 L de capacidad, a razón de 3 L por recipiente. Posteriormente, cada recipiente se inoculó con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas (Lalvin 71B, Lallemand) a una concentración de 30 g de levaduras secas cada 100 L de mosto, y pre-hidratadas según instrucciones del fabricante.

Así, se elaboraron por triplicado vinos blancos a partir de los mostos producto de cuatro tratamientos diferentes (C, AS 1, AS 2, L) (Fig. 4.2 B). Las fermentaciones se llevaron a cabo en cuartos a temperatura controlada entre 18 y 20° C. El progreso de la fermentación alcohólica se monitoreó diariamente mediante medidas de turbidez, así como medidas de índice de refracción y densidad (por medio de un refractómetro y un areómetro, respectivamente), por ser estos dos últimos parámetros proporcionales al contenido de azúcares disueltos. Finalizadas las fermentaciones, los vinos blancos se mantuvieron a 20° C durante 12 días y luego las lías gruesas fueron eliminadas mediante un paso de

trasiego a recipientes limpios, los cuales posteriormente fueron almacenados durante 40 días a 5° C para promover la clarificación estática de los vinos elaborados; durante este último período se realizó un trasiego adicional a todos los vinos y posteriormente se les realizaron las determinaciones químicas mencionadas más adelante. Finalmente, previa adición de 50 mg/L de KMBS a cada recipiente, los vinos se guardaron en botellas de 500 ml de capacidad y se almacenaron a 5° C.

Vinificaciones en tinto

Se elaboraron vinos tintos a partir de uvas tintas variedad Tempranillo, provenientes de *V. vinífera* de viñedos locales de la provincia de La Rioja, España. Un total de 70 kg de uvas se despalilló y estrujó manualmente. La pasta obtenida se recibió en un depósito de 100 L e inmediatamente después se suplementó con 77 mg/L de KMBS. Las vinificaciones se realizaron en recipientes cilíndricos de 3.8 L de capacidad, idénticos a los utilizados durante la elaboración de vinos blancos. La pasta se repartió uniformemente en cada uno de los recipientes, llenados hasta un volumen de 3 L, y poniendo especial atención en que la proporción de hollejos y de mosto en todos los recipientes fuese similar. Se elaboraron cuatro vinos tintos diferentes, según el preparado enzimático utilizado (Fig. 4.3):

- Control, sin el agregado de enzimas (C)
- Agregado de PP-AS en dos cantidades diferentes:
 - 0.045 g / 3.0 L de mosto (AS 1)
 - 0.090 g / 3.0 L de mosto (AS 2)
- Agregado de Lallzyme C-max, a razón de 0.090 g / 3.0 L de mosto (L).

Inmediatamente posterior al agregado de los preparados enzimáticos los recipientes se inocularon con 30 g de levadura seca *S. cerevisiae* (Lalvin 71B, Lallemmand) cada 100 L de mosto, pre-hidratadas según indicaciones del fabricante. Se realizaron tres vinificaciones por cada tipo de vino (C, AS 1, AS 2, L), en condiciones de temperatura controlada entre 18 y 20° C y siguiendo técnicas tradicionales de vinificación. El progreso de la fermentación alcohólica se monitoreó diariamente mediante medidas de densidad, considerándose como finalizada cuando la concentración de azúcares reductores alcanzó valores menores a 3 g/L (5^{to} día). El proceso se extendió por cuatro días más como período

de maceración post-fermentativa. Al final de este período se realizó el descubado de los vinos, separando la fase líquida de los hollejos y colectando así solamente el vino de yema en recipientes limpios. Posteriormente los vinos se mantuvieron a 5° C durante 30 días para promover la clarificación estática de los mismos, realizándose durante este período un trasiego adicional. Los vinos clarificados se sometieron a análisis químicos y cromáticos y después se embotellaron y almacenaron a 15° C en bodega durante seis meses, para finalmente someterse a análisis por HPLC.

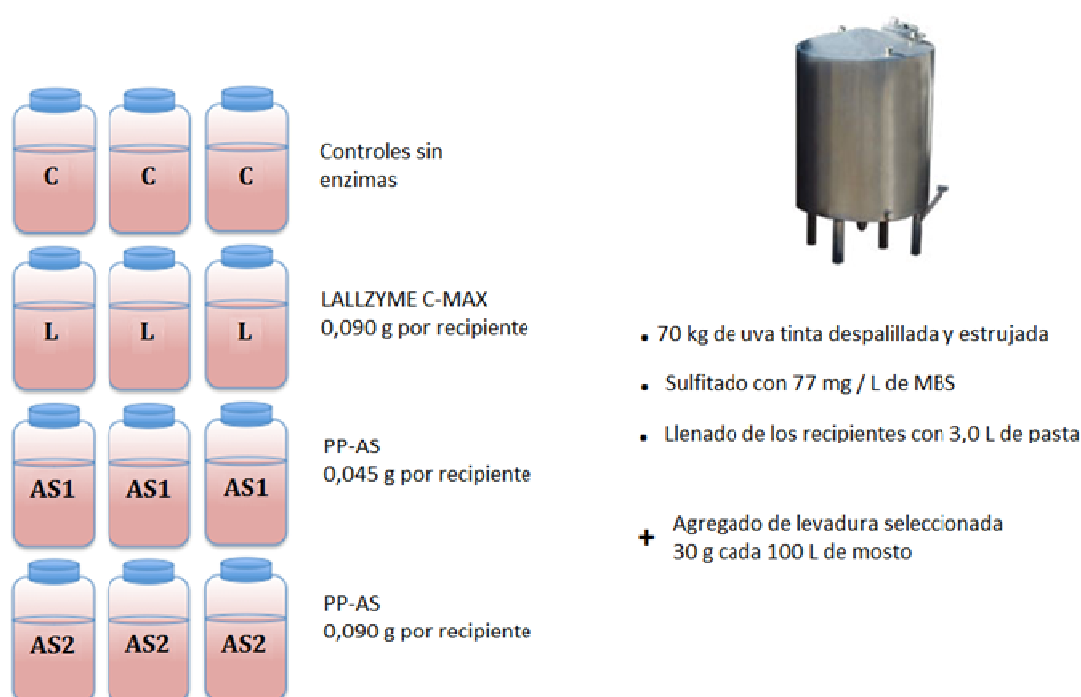


Figura 4.3. Esquema del procedimiento seguido en los ensayos de vinificación en tinto.

Análisis químicos

Al vino o al mosto, según corresponda, se le realizaron análisis de pH, acidez total, acidez volátil, concentración de SO₂ libre y total, y concentración de azúcares reductores siguiendo métodos descritos por la Organización Internacional de la Viña y el Vino [OIV, 2014]. La determinación de la acidez total se realizó por valoración potenciométrica de las muestras con una solución titulada de NaOH 0.1 M hasta pH 7.00, previa eliminación del CO₂ presente haciendo vacío con una trompa de agua a las muestras contenidas en un matraz

kitasato. La acidez volátil, derivada fundamentalmente del ácido acético, se determinó por destilación fraccionada del vino exento de CO_2 y valoración separada de las fracciones recogidas, utilizando NaOH 0.02 M y fenolftaleína como indicador. El SO_2 libre se determinó por volumetría redox con I_2 0.02 N y utilizando almidón como indicador, previa acidificación de la muestra con H_2SO_4 al 25 % (v/v) para evitar interferencias por oxidación de polifenoles del vino. Para la determinación del SO_2 total, a la muestra de vino se le adicionó NaOH 1 M para liberar por hidrólisis alcalina el SO_2 combinado, y se procedió de forma análoga al caso anterior. Los azúcares reductores se determinaron por reducción de estos con solución cupro-alcalina a ebullición, seguido de un paso de enfriado, acidificación con H_2SO_4 al 25 % (v/v), reacción del cobre sobrante con exceso de KI y titulación por retorno del yoduro remanente con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; antes de comenzar con la determinación, se eliminó de las muestras de vino toda materia reductora distinta de los azúcares por adsorción a carbón activado, seguido de filtración con papel de filtro. El grado alcohólico se determinó mediante el método ebulliométrico, basado en medir la temperatura de ebullición del vino y compararla con la del agua.

El contenido de nitrógeno fácilmente asimilable (aminoácidos libres + catión amonio; NFA) del mosto de uva blanca se determinó mediante valoración con NaOH de la caída de pH producida por la formación de derivados metilénicos de amonio y aminoácidos luego de la adición al mosto de un exceso de formaldehído [Shively & Henick-Kling, 2001].

El contenido de ácido L-málico y L-láctico de los mostos y vinos se determinó utilizando kits enzimáticos comerciales (L-Malic acid Cat. No. 10 139 068 035 y L-Lactic acid Cat. No. 10 139084 035; R-Biopharm, Darmstadt, Alemania) siguiendo instrucciones del fabricante y según los métodos enzimáticos descritos por la OIV [OIV, 2014].

Análisis cromáticos

Se analizaron las características cromáticas de los vinos tintos durante la fermentación alcohólica y una vez terminado el proceso de elaboración. La intensidad de color y la tonalidad se analizaron por espectrofotometría utilizando celdas de 0.1 cm de camino óptico, mientras que para los fenoles totales se utilizaron celdas de 1 cm. Previa realización de dichas determinaciones, las muestras se clarificaron por centrifugación ($6000\times g$, 10 minutos). La intensidad

de color se expresó como intensidad colorante (IC) en celdas de 1 cm de camino óptico, calculado como la suma de las absorbancias medidas a 420, 520 y 620 nm [OIV, 2014]. Los fenoles totales se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm de muestras de vino tinto diluidas en agua desionizada 50 veces y se expresaron como índice de polifenoles totales (IPT), según Ribéreau-Gayon et al. [2006].

Los parámetros CIELab de los vinos tintos se calcularon finalizada la fermentación alcohólica, para lo cual se registró la transmitancia de los vinos a lo largo de todo el espectro visible (380 – 770 nm, a intervalos de 10 nm), utilizando el iluminante D65 y 10° de campo visual para los cálculos. Los parámetros L* (claridad), C* (croma), H* (tono), a* (componente rojo/verde del color) y b* (componente azul/amarillo del color) se calcularon de acuerdo a OIV [2014]. La existencia de diferencias en el color de dos muestras A y B se estableció utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta E^*_{A, B} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Análisis cromatográficos realizados al vino tinto

Antocianinas: la determinación de antocianinas se llevó a cabo siguiendo el método oficial OIV-MA-AS315-11 mediante análisis directo de las muestras de vino tinto por HPLC de fase reversa [OIV, 2014]. Las cinco antocianinas no acetiladas más importantes y las cuatro antocianinas acetiladas principales se identificaron en base a sus tiempos de retención al ser detectadas a 518 nm, empleando malvidina como estándar externo.

Fracción no antocianínica: los análisis de la fracción fenólica distinta de antocianinas se llevaron a cabo según Ginjom et al. [2011]. De acuerdo a este método, muestras de 5 ml de vino tinto se desalcoholizaron al vacío y posteriormente se acidificaron. Los compuestos fenólicos no antocianínicos se extrajeron de las muestras acidificadas usando dietiléter (3 x 5 ml) seguido y acetato de etilo (3 x 10 ml). Posteriormente las fracciones orgánicas se juntaron y se eliminó el solvente bajo corriente de nitrógeno gaseoso, almacenándose las muestras secas a 20° C hasta su análisis por HPLC de fase reversa. Los compuestos se identificaron según sus tiempos de retención en el espectro UV/Vis utilizando estándares externos, y su cuantificación se realizó a las longitudes de onda de mayor sensibilidad para cada familia de compuestos fenólicos [Ginjom et al., 2011]: 280 nm para ácidos hidroxibenzoicos y flavanoles, empleando ácido

gálico y catequina como patrones externos; 230 nm para ácidos hidroxicinámicos, utilizando ácido cafeico y ácido cumárico como estándares externos; y 360 nm para flavonoles, empleando como estándar externo quercetina.

Aminoácidos: Los aminoácidos y las aminas biogénicas se analizaron por HPLC de fase reversa previa derivatización con dietiletoximetilenmalonato, de acuerdo al método de Gómez-Alonso et al. [2007], con la salvedad de que el volumen de inyección se fijó en 20 µl. Se detectaron e identificaron las aminoácidos derivadas de quince aminoácidos y cuatro aminas biogénicas en base a sus tiempos de retención, empleando los patrones externos indicados en la sección “**Reactivos**”.

Los análisis cromatográficos se realizaron en un sistema de HPLC Waters (Milford, MA, EUA) equipado con una bomba binaria Waters 1525, un autosampler Waters 717 plus y un detector de arreglo de diodos Waters 2996. Se empleó una columna de fase reversa C18 X-Bridge de Waters (5 µl de relleno, 250 mm x 4.6 mm).

Análisis Estadísticos

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), al mostrar éstos una distribución normal y varianzas homogéneas. La significancia estadística entre los valores medios se discriminó aplicando el test LSD de Fisher. Se realizó a su vez un análisis de componentes principales (PCA) para distinguir entre los distintos tipos de vinos elaborados en base a su composición final de polifenoles y aminoácidos. El procesamiento de los datos se realizó por medio de los programas SPSS Statistics 19.0 (IBM-SPSS; Chicago, IL, EUA) y Statistica 7.0 (Stat Soft; Tulsa, OK, EUA).

Resultados y discusión

Caracterización de actividades enzimáticas relevantes

Como se explicó anteriormente, las preparaciones pectolíticas de aplicación enológica pueden contener varias actividades enzimáticas [Fia et al., 2014] y muchas de ellas tienen un rol importante en la elaboración de vino, pudiendo impactar en la calidad del producto final. En la Tabla 4.1 se resumen los resultados correspondientes a la determinación de siete actividades enzimáticas

principales, tanto en PP-AS como en el preparado comercial Lallzyme C-max. Puede verse que las actividades PGasa y XYLasa representan la totalidad de las actividades enzimáticas analizadas a PP-AS y que, como es de esperarse, la actividad PGasa es la mayoritaria. En el caso del preparado comercial, si bien presenta actividad XYLasa y la actividad pectolítica es también la más abundante, éste a su vez posee otras carbohidrasas relevantes, como ser las actividades celulolíticas endo-glucanasa y β -glucosidasa.

Tabla 4.1. Actividades enzimáticas analizadas en PP-AS y en el preparado comercial.

Actividad enzimática ^a (sustrato)	PP-AS		Lallzyme C-max	
	U / mg de proteína	U / g de preparado seco	U / mg de proteína	U / g de preparado seco
Poligalacturonasa (APG)	246 \pm 11.9	722 \pm 35	50.0 \pm 6.2	125.7 \pm 15.5
Poligalacturonasa (pectina)	51.5 \pm 9.9	151 \pm 29	59.0 \pm 8.8	148 \pm 22
Pectin-liasa	nd	nd	nd	nd
Pectinesterasa	nd	nd	108 \pm 3.00	272 \pm 7.54
Xilanasa	0.74 \pm 0.11	2.17 \pm 0.31	0.15 \pm 0.03	0.37 \pm 0.07
Celulasa total	nd	nd	nd	nd
Endo-glucanasa	nd	nd	1.83 \pm 0.21	4.60 \pm 0.53
β -glucosidasa	nd	nd	0.07 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02

^a Las actividades enzimáticas se determinaron a pH 3.5 y 20° C, asemejando las condiciones dadas en la vinificación. Las cifras exhibidas corresponden a las medias calculadas con tres determinaciones \pm desvío estándar.

nd: no detectada.

La actividad PGasa frente a APG, el sustrato normalmente utilizado para ensayos de cuantificación, resultó ser más de cinco veces mayor en PP-AS que en el preparado comercial utilizado. Por otro lado, Guérin et al. [2009] informaron que la actividad PGasa media, determinada a 40° C, de doce preparados comerciales formulados para extracción de color fue de 142 U/mg de proteína. Estos datos ayudan a que los niveles de actividad PGasa que presenta PP-AS puedan contextualizarse y cobrar un sentido práctico, pudiendo además considerarse que tanto los valores de actividad PGasa específica como la actividad PGasa presente en cada gramo de la preparación de *A. sojae* obtenida sería en principio adecuada. Una actividad PGasa elevada podría compensar la

ausencia de actividad pectin-liasa en PP-AS, la cual suele encontrarse presente en los preparados pectolíticos comerciales de uso enológico. Resulta curioso no haber detectado actividad pectin-liasa en Lallzyme C-max dado que la presencia de dicha enzima está descrita por el fabricante; una posible explicación es que la actividad pectin-liasa no pueda evidenciarse a las condiciones de pH y temperatura en las que se llevó a cabo el ensayo. Cabe destacar que para la determinación de actividad pectin-liasa se empleó como control positivo una preparación comercial líquida de pectin-liasa pura (Panzym® Smash XXL; Eaton, Tinton Falls, EUA) de modo de descartar falsos negativos por problemas propios de la puesta a punto del ensayo. Por otro lado, una menor actividad PGasa de PP-AS cuando el APG es reemplazado por pectina se condice con los resultados presentados en el capítulo 3, relacionados a la especificidad de sustrato de la endo-PGasa *A. sojae*, y es consistente con la especificidad de sustrato de varias PGasas reportadas [Contreras-Esquivel & Voget, 2004, Pedrolli & Carmona, 2010]. Respecto a la actividad pectinesterasa, esta no fue detectada en PP-AS en las condiciones de ensayo, lo cual es importante debido a que esta cataliza la liberación de metanol desde las sustancias pécticas hacia el vino y el metanol en concentraciones elevadas puede provocar efectos tóxicos en humanos [Robins et al., 1981].

A fin de descartar cualquier efecto negativo que el SO₂, agregado normalmente al mosto y al vino como agente antioxidante y antimicrobiano, pudiera generar en la actividad PGasa, se realizaron ensayos de actividad y estabilidad frente a este compuesto. En la práctica durante las vinificaciones, esta molécula en solución inhibe en importante medida la actividad polifenol oxidasa de la enzima tirosinasa proveniente de la uva [Dubernet & Ribéreau-Gayón, 1973]. Si bien se ha reportado que la acción de las pectinasas aplicadas o potencialmente aplicables durante procesos de vinificación puede verse afectada por el SO₂ [Takayanagi et al., 2002; Merín & Morata de Ambrosini, 2015], la actividad PGasa de PP-AS no fue afectada por concentraciones de SO₂ de hasta 200 mg/L (Fig. 4.4 A), valor considerado como el límite legalmente permitido en vinos según la OIV, y permaneció completamente estable luego de incubaciones durante seis días frente a este aditivo (Fig. 4.4 B).

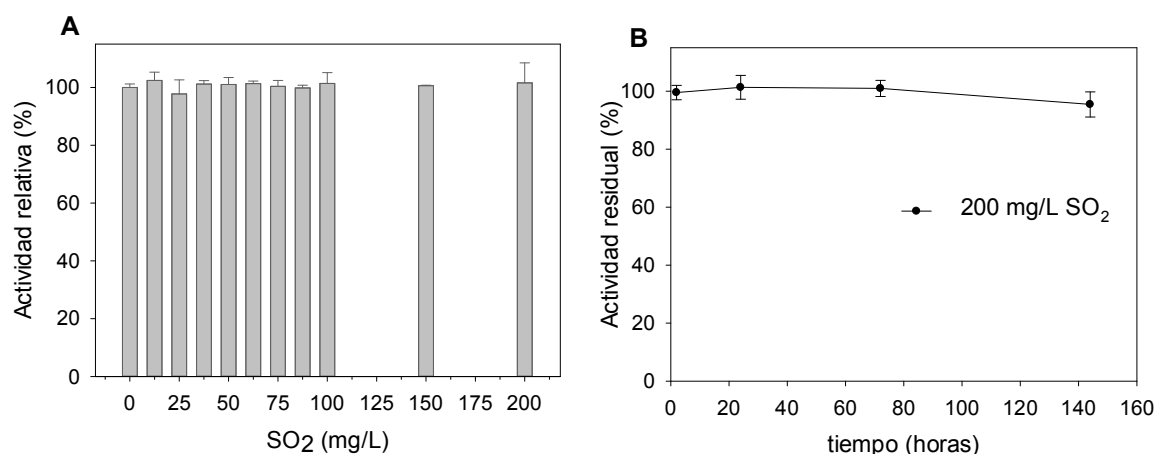


Figura 4.4. Efecto del SO₂ en la actividad PGasa (A) y en su estabilidad (B). Las barras de error corresponden al desvío estándar de los valores medios graficados, calculados mediante tres determinaciones.

Las enzimas celulolíticas comprenden un amplio grupo de enzimas, entre las que se incluyen endo-glucanasas (EC 3.2.1.4), celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), las cuales actúan en conjunto para promover una degradación eficiente de la pared celular. Además de su contribución a procesos de clarificación mediante la remoción de glucanos del vino y mosto, a estas enzimas se les ha atribuido la propiedad de incrementar el color de los vinos y facilitar la liberación de taninos unidos a paredes celulares [Joutei et al., 2003]. A diferencia del preparado comercial, el cual resultó positivo para actividad endo-glucanasa, PC-AS no exhibió actividad frente a celulosa o frente a sustratos derivados de la misma, y adicionalmente ambos probaron poseer actividad XYLasa, siendo el nivel de esta actividad en PC-AS significativamente mayor que en la preparación comercial. Zietsman et al. [2015a] reportaron un efecto sinérgico de las actividades PGasa y XYLasa en la degradación de tejidos durante la maceración en un sistema modelo utilizando tejidos celulares provenientes de la piel de uvas. Consecuentemente, la presencia de ambas actividades XYLasa y PGasa en preparaciones enzimáticas para aplicación en vino puede considerarse una característica relevante y de valor.

Respecto a la actividad β -glucosidasa, su presencia en preparaciones enzimáticas de uso enológico puede procurarse o evitarse según el tipo de vino que se quiera elaborar y dependiendo de qué propiedades sensoriales quieran resaltarse en el producto. Así, las preparaciones enzimáticas comercializadas para la liberación de aromas suelen diferenciarse de las demás preparaciones

enológicas en que contienen un nivel significativamente mayor de actividades glicosidasas específicas [Guérin et al., 2009], entre ellas la β -glucosidasa, por catalizar la hidrólisis de enlaces glicosídicos entre residuos terpénicos aromáticos y monosacáridicos presentes normalmente como heterósidos terpénicos en la piel de la uva [Ribéreau-Gayon et al., 2006]. Por otro lado, la actividad β -glucosidasa puede ser deletérea para la estabilidad del color ya que es posible que el enlace β -glicosídico de las antocianinas, responsables del color rojizo del vino tinto, sea hidrolizado por estas enzimas [Wightman & Wrolstad, 1996]. PC-AS no exhibió actividad β -glucosidasa, mientras que la misma sí está presente en el preparado comercial utilizado en este trabajo.

Clarificación enzimática de mosto de uva blanca

La composición analítica del mosto resultante del despalillado y prensado de uvas blancas se muestra en la Tabla 4.2. Un valor de densidad de 1080 g/L corresponde aproximadamente a una concentración de azúcares totales de 187 g/L y a un grado probable volumétrico (número de volúmenes de alcohol puro, a 20° C, que puede obtenerse por fermentación total de los azúcares contenidos en 100 volúmenes de producto a dicha temperatura) de 11,1 %, ya que se considera que son necesarios 17 g/L de azúcares para producir un grado alcohólico en la vinificación en blanco. En cuanto al NFA, los niveles son adecuados ya que un mosto con un nivel de azúcares de alrededor de 200 g/L debe contener al menos 150 mg/L de nitrógeno para no considerarse nutricionalmente deficiente [Henschke & Jiranek, 1993].

Tabla 4.2. Composición del mosto de uva blanca

Parámetro	Valor
Densidad ^a (g/L)	1080
pH ^a	3.35
Acidez total ^b (g/L)	6.0
NFA (mg nitrógeno/L)	196
Turbidez (NTU)	1040

^a Expresado a 20° C. ^b Expresado como ácido tartárico.

A lo largo del tratamiento de clarificación, los mostos suplementados con los preparados enzimáticos experimentaron un descenso de turbidez que fue,

finalizado el proceso, claramente mayor que el que experimentaron los mostos control sin el agregado de enzimas (Fig. 4.5).

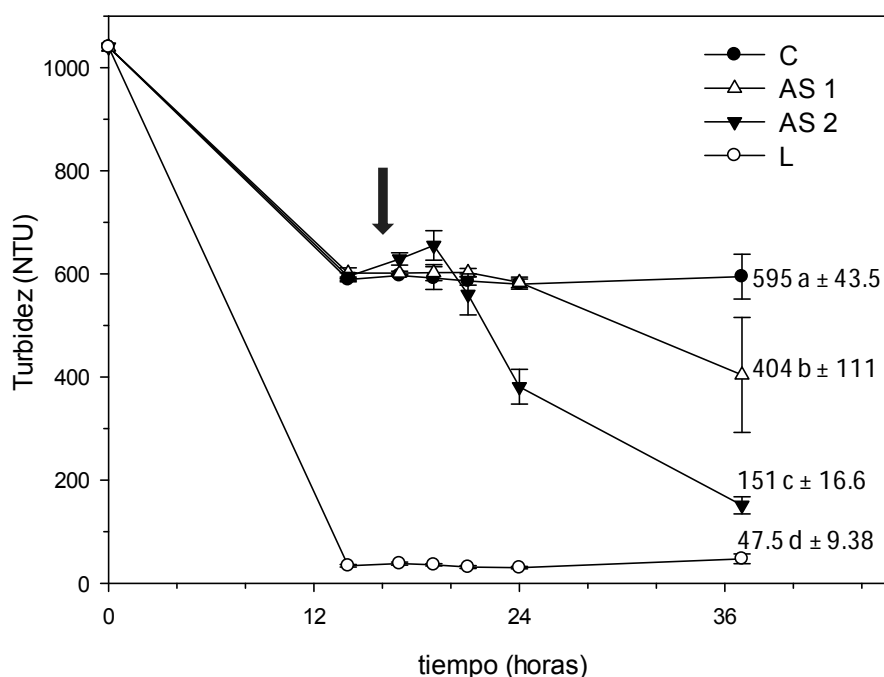


Figura 4.5. Evolución de la turbidez del mosto durante la clarificación pre-fermentativa. Las barras de error representan el desvío estándar de la media, calculado con cuatro réplicas.

C: control sin agregado de enzimas; AS 1: PP-AS (0.02 g / 3.8 L); AS 2: PP-AS ($t \leq 16$ horas 0.01 g / 3.8 L, $t \geq 16$ horas 0.04 g / 3.8 L); L: preparado comercial (0.114 g / 3.8 L). La flecha indica el momento de adición del refuerzo de PP-AS a los mostos AS 2.

Las cifras exhibidas a la derecha de cada gráfico corresponden a los valores finales de turbidez de los mostos \pm desvío estándar, pasadas 36 horas. Letras diferentes indican diferencias significativas según test LSD ($p < 0.05$).

A las 36 horas de comenzado el tratamiento la turbidez media de los mostos AS 1, tratados con 0.02 g de PP-AS, fue de 404 NTU, mientras que la de los mostos AS 2, tratados con una cantidad que duplica la de los mostos AS 1, llegó a 151 NTU; estos valores que reflejan el grado de clarificación de mosto finalizado el tratamiento ponen de manifiesto un efecto concentración-dependiente de PP-AS. Las diferencias significativas en turbidez de los mostos tratados con PP-AS respecto de los mostos control comienzan a apreciarse temporalmente antes en AS 2 que en AS 1, habiendo entre estos una diferencia de 200 NTU pasadas 24 horas de comenzado el tratamiento, atribuible al agregado a las 16 horas de un

refuerzo de PP-AS a los mostos AS 2. Respecto a los mostos tratados con la preparación comercial, estos presentaban luego de 14 horas menos de 50 NTU de turbidez, valores que se mantuvieron hasta el final del tratamiento. En la Fig. 4.6 se muestra una fotografía de los mostos tomada al final del tratamiento, en donde las diferencias de turbidez pueden distinguirse claramente a la vista.

Cabe destacar que la cantidad de PP-AS utilizada en los ensayos de desfangado fue casi tres y seis veces menor (según se comparen los mostos AS 1 o AS 2) que la cantidad empleada de preparado comercial, puesto que las actividades por gramo de preparado sobre pectina de manzana son similares entre sí (Tabla 4.1). La utilización de pectina como sustrato para la determinación actividad PGasa mediante cuantificación de azúcares reductores por Somogyi-Nelson no es aconsejable, debido a que las condiciones del ensayo (hervido de las muestras en medio alcalino) aceleran sensiblemente la despolimerización β -eliminativa a nivel los galacturónidos metoxilados de la pectina [BeMiller & Kumari, 1972]. Conscientes de esta limitación, se tomaron los recaudos necesarios para que la despolimerización no enzimática fuera debidamente calculada en blancos de reacción y se empleó igualmente pectina, dado que permite una comparación rápida y sencilla de actividades pectolíticas en PP-AS y Lallzyme C-max contemplando hidrolasas y liasas, lo cual resultó sumamente útil para calcular la cantidad de PP-AS a agregar al mosto.

Un desfangado excesivo (turbidez < 100 NTU) puede conllevar al empobrecimiento del mosto en componentes nutrientes nitrogenados [López-Martín et al., 2004] y a una disminución en el aroma afrutado característico de vinos blancos secos [Ribéreau-Gayon et al., 2006], por lo que la cantidad del preparado comercial agregada a los mostos L fue excesiva respecto de la duración del tratamiento. Del otro lado del espectro, un mosto pobremente clarificado promueve una excesiva formación de alcoholes superiores malolientes por parte de las levaduras, y entre todos ellos el 3-(metil-tio)-1-propanol es de particular importancia porque posee el umbral de percepción más bajo y su olor desagradable es persistente y muy difícil de eliminar [Ribéreau-Gayon et al., 2006]. En general se considera entre 100 y 250 NTU de turbidez como un nivel válido para todas las variedades de vinos blancos, por considerarse valores de compromiso adecuados para dar una buena fermentación alcohólica y finura aromática al vino.



Figura 4.6. Fotografía de los mostos tomada 36 horas de comenzado el tratamiento de desfangado. C: control sin agregado de enzimas; AS 1: PP-AS (0.02 g / 3.8 L); AS 2: PP-AS ($t \leq 16$ horas 0.01 g / 3.8 L, $t \geq 16$ horas 0.04 g / 3.8 L); L: preparado comercial (0.114 g / 3.8 L).

El nivel de clarificación alcanzado en los mostos L se debe en gran medida al agregado de tres veces más preparado comercial que lo recomendado por el fabricante, y se realizó para garantizar un control positivo que clarificase en forma eficaz aún a riesgo de sobre-clarificación, hecho que finalmente ocurrió (Fig. 4.5). A fin de poder favorecer una adecuada fermentación alcohólica, finalizado el desfangado se agregaron lías provenientes del tratamiento con el preparado comercial a los mostos L clarificados hasta ajustar la turbidez a aproximadamente 150 NTU.

Vinificaciones en blanco y composición final

La cinética de fermentación de los vinos blancos se muestra en la Fig. 4.7. Puede observarse que luego de aproximadamente 5 días en los vinos C, AS 1 y AS 2, y 6 días en los vinos L, la densidad, directamente proporcional al nivel de azúcar, llegó a un valor constante, indicativo del fin de la fermentación alcohólica (Fig. 4.7 A). Las vinificaciones en blanco se realizan sin hollejos, por lo que el seguimiento de la turbidez a lo largo de la fermentación alcohólica resultó ser un parámetro que permitió estimar más o menos el final del proceso, el cual coincide aproximadamente con el momento en el que la turbidez del cultivo comienza a descender (Fig. 4.7 B), debido a la decantación de las levaduras en suspensión.

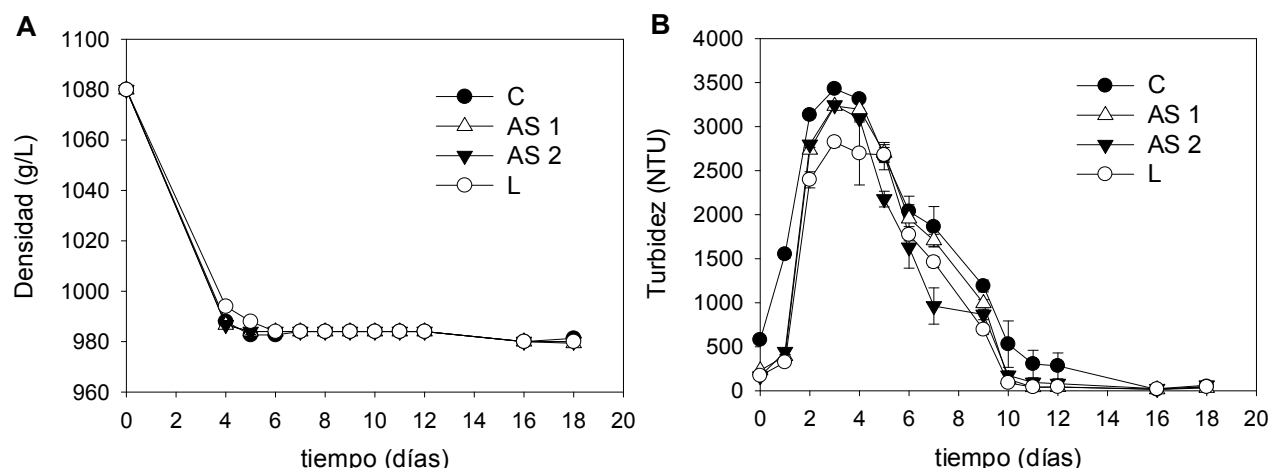


Figura 4.7. Cinética de fermentación alcohólica de los vinos blancos.

(A) Evolución de la densidad durante la fermentación (B) Evolución de la turbidez durante la fermentación. Las barras de error representan el desvío estándar de la media, calculado con tres réplicas.

La composición general de los vinos blancos producidos con los mostos clarificados enzimáticamente (AS 1, AS 2, L) y los vinos producidos con los mostos control (C) se muestra en la Tabla 4.3. Todos los parámetros se encontraron dentro de los valores normales y por debajo de los límites máximos permitidos.

Los valores de azúcares reductores residuales de todos los vinos permiten clasificarlos dentro de los vinos “secos” (azúcares residuales < 5 g/L; [OIV, 2014]). Puede observarse que la concentración residual de azúcares reductores de los vinos C fue menor que la de vinos AS 1 y AS 2. En línea con estos resultados, Olivier et al. [1987] reportaron una mayor cantidad de azúcares reductores residuales en vinos altamente clarificados. Disminuir la turbidez del mosto clarificado prolonga la fermentación alcohólica y dependiendo del grado de clarificación del mosto puede llegar a detenerse la fermentación, generando, en consecuencia, vinos con una mayor proporción de azúcares reductores [Ribéreau-Gayon et al., 2006]. De todas formas, en el caso de los vinos aquí producidos la cinética de fermentación fue prácticamente similar en todos los casos y las diferencias en el nivel final de azúcares reductores, si bien estadísticamente significativas, son pequeñas y por ende no necesariamente asociadas a los niveles de turbidez del jugo al comienzo de la fermentación alcohólica. Además, aún cuando la fermentación alcohólica ha sido completada, los vinos contienen siempre pequeñas cantidades de azúcares residuales, en el orden de 1-2 g/L [Ribéreau-Gayon et al., 2006].

Tabla 4.3. Parámetros enológicos de los vino blancos elaborados

	C	AS 1	AS 2	L
Azúcares reductores (g/L)	2.16a ± 0.08	2.35b ± 0.03	2.31b ± 0.04	2.42b ± 0.12
pH	3.18a ± 0.02	3.14b ± 0.01	3.13b ± 0.01	3.14b ± 0.01
Acidez total ^a (g/L)	6.2a ± 0.1	5.8b ± 0.1	6.0b ± 0.1	5.9b ± 0.1
Acidez volátil ^b (g/L)	0.16a ± 0.02	0.15a ± 0.01	0.16a ± 0.02	0.15a ± 0.01
Grado alcohólico (% a 20° C)	10.7a ± 0.10	10.7a ± 0.01	10.7a ± 0.01	10.7a ± 0.06
SO ₂ libre (mg/L)	3.41a ± 0.95	5.55b ± 0.74	5.55b ± 0.37	6.19b ± 0.37
SO ₂ total (mg/L)	11.20a ± 1.60	13.33b ± 0.92	14.93bc ± 0.92	16.53c ± 0.92
Ácido L-málico (g/L)	0.83a ± 0.25	1.42c ± 0.07	1.44c ± 0.04	1.17b ± 0.04
Ácido L-láctico (g/L)	0.72a ± 0.21	0.22b ± 0.01	0.21b ± 0.01	0.32b ± 0.01

Determinaciones realizadas dentro de la semana previa al embotellado. ^aExpresado como ácido tartárico, ^bExpresado como ácido acético. Valores correspondientes a las medias de tres vinificaciones réplica ± desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según test LSD ($p < 0.05$).

En el caso del SO₂, una menor proporción comparativa en los vinos control puede asociarse a una mayor acción antimicrobiana y protectora frente a enzimas oxidativas durante la fase previa a la inoculación con levadura seleccionada. Esto sería debido a una carga microbiana autóctona más elevada en estos mostos por no haber clarificado en la medida en que lo hicieron los mostos tratados con PP-AS o con el preparado comercial. Además, el desfangado disminuye la actividad polifenol oxidasa debido a que al menos algunas de las enzimas oxidativas presentes en el mosto se encuentran en gran medida asociadas a las partes sólidas de la uva [Du Toit et al., 2006].

Las diferencias significativas en los niveles de ácido L-málico y L-láctico entre los vinos control y los vinos elaborados con mostos desfangados enzimáticamente cobran importancia ya que reflejan en estos el acontecimiento de una fermentación maloláctica: la transformación de ácido L-málico en ácido L-láctico. Las levaduras metabolizan sólo una fracción del ácido L-málico, típicamente hacia piruvato, por lo que el metabolismo bacteriano es responsable de las diferencias en observadas en concentración de este ácido entre los vinos control y

los elaborados con mostos clarificados con enzimas (Tabla 4.3 y Fig. 4.8). Las bacterias ácido lácticas forman parte de la microflora normal de vinos blancos y tintos, y desde el comienzo hasta el final de la fermentación alcohólica, e incluso durante el añejamiento y almacenamiento de los vinos, alternan períodos de crecimiento, regresión y latencia. Dejando de lado las hexosas y las pentosas residuales del vino, la molécula más fácilmente utilizable es el ácido málico, por lo que la fermentación maloláctica constituye un primer signo del desarrollo de las bacterias lácticas. La fermentación maloláctica en vinos tintos es un evento deseado, ya permite suavizar al vino mediante una desacidificación (transformación de un ácido dicarboxílico en uno monocarboxílico) y el reemplazo del ácido málico por el ácido láctico, de sabor menos agresivo. En vinos blancos, en cambio, dicho fenómeno es deseable en una proporción minoritaria, siendo típicamente favorable en vinos Chardonnay, pero evitándose en muchos otros varietales tales como Sauvignon Blanc [Ribéreau-Gayon et al., 2006], Viura, característico de la región de La Rioja en España, y Torrontés, este último elaborado con la cepa de *V. vinifera* autóctona de Argentina y una de las más vastas en cuanto a superficie cultivada de uva blanca en el país [INV, 2016]. Con estos últimos tipos de vino blanco se busca conservar los niveles de ácido málico con el fin de mantener la acidez y las características varietales frescas y afrutadas [Boulton et al., 1999].

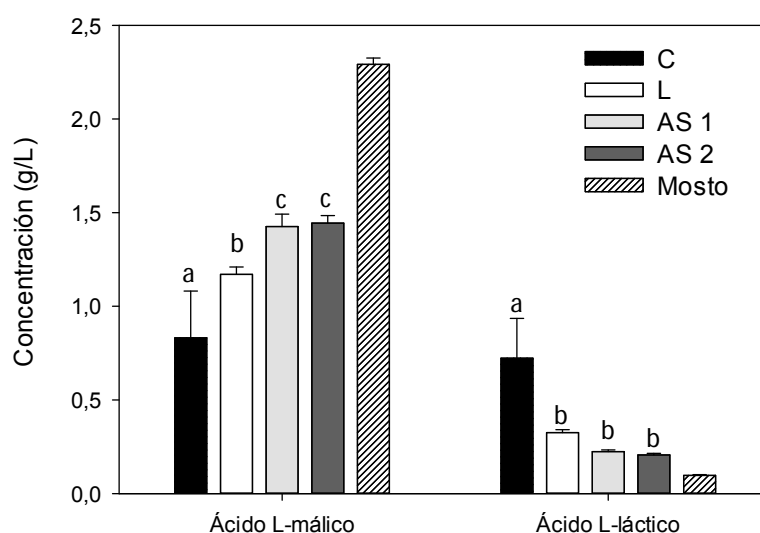


Figura 4.8. Contenido de ácido L-málico y L-láctico del mosto y de los vinos blancos. Valores correspondientes a las medias de tres vinificaciones réplica \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según test LSD ($p < 0.05$).

En la Fig. 4.8 puede verse que el contenido de ácido L-láctico de los vinos AS 1 y AS 2 es ligeramente mayor que el del mosto, pero 3.3 veces menor que el de los vinos control, lo cual indica que estos últimos han experimentado fermentación maloláctica, mientras los vinos AS 1, AS 2 y L prácticamente no lo han hecho, o sí, pero muy limitadamente. Resulta importante destacar cómo en todos los vinos elaborados se observa claramente que una disminución en los niveles de ácido L-málico es acompañada por un incremento concomitante de ácido L-láctico. En línea con la argumentación dada para explicar las diferencias en el SO₂ de los vinos, una menor actividad bacteriana en los vinos cuyos mostos han sido clarificados con PP-AS y Lallzyme C-max puede muy probablemente estar relacionada con una menor carga microbiana debida a un desfangado más eficaz logrado en los mostos AS 1, AS 2 y L, respecto de los mostos control. La preservación del ácido málico, significativamente mayor en los vinos PP-AS respecto de los vinos control, e incluso también de los vinos elaborados con el preparado comercial (Tabla 4.3), es un aspecto buscado en la elaboración de vinos blancos de Viura, como los elaborados en este trabajo.

Desarrollo del color durante la maceración fermentativa en vinificaciones en tinto

Los valores de densidad y pH, expresados a 20° C, del mosto de Tempranillo resultante del despalillado y estrujado de la uva fueron 1092 g/L y 3.60, respectivamente. De la cinética de fermentación de los vinos tintos se obtiene que al día 6 de inoculados los mostos la densidad, directamente proporcional al contenido de azúcar, llegó a un valor constante en todos los vinos, indicativo del fin de la fermentación alcohólica (Fig 4.9 A). A su vez, se observa que el curso temporal del consumo de azúcares fue prácticamente idéntico en todas las vinificaciones.

Como es de esperarse, la presencia de hollejos (piel y semillas) en las vinificaciones en tinto no permite seguir la fermentación alcohólica mediante medidas de turbidez, ya que la luz es dispersada indistintamente por las levaduras en crecimiento y por los fragmentos vegetales (Fig. 4.9 B).

Con la finalidad de evaluar si PP-AS puede ser utilizado para mejorar la extracción de materia colorante en vinificaciones en tinto, se monitoreó la IC a lo largo de la fermentación/maceración de cuatro lotes de vinificaciones diferentes,

esto es, aquellos dos a los que se agregó PP-AS, el lote suplementado con el preparado comercial y el lote control sin agregado de enzimas (Fig. 4.10).

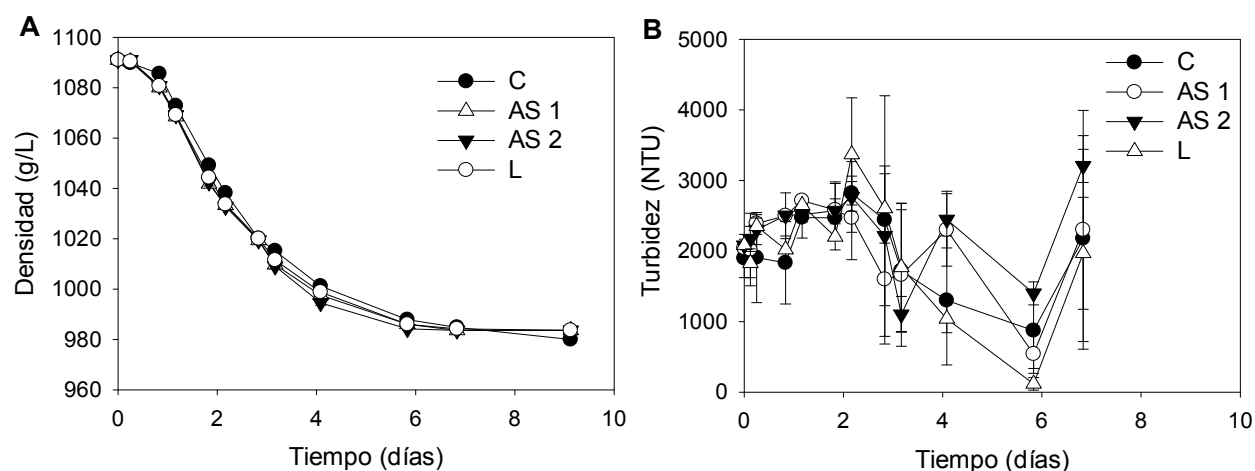


Figura 4.9 (A) Cinética de fermentación alcohólica de los vinos tintos por seguimiento de la densidad durante la fermentación. (B) Seguimiento de la turbidez durante la fermentación. Las barras de error representan el desvío estándar de la media, calculado con tres réplicas. C: control sin agregado de enzimas; AS 1: PP-AS (0.045 g / 3.0 L); AS 2: PP-AS (0.090 g / 3.0 L); L: preparado comercial (0.090 g / 3.0 L).

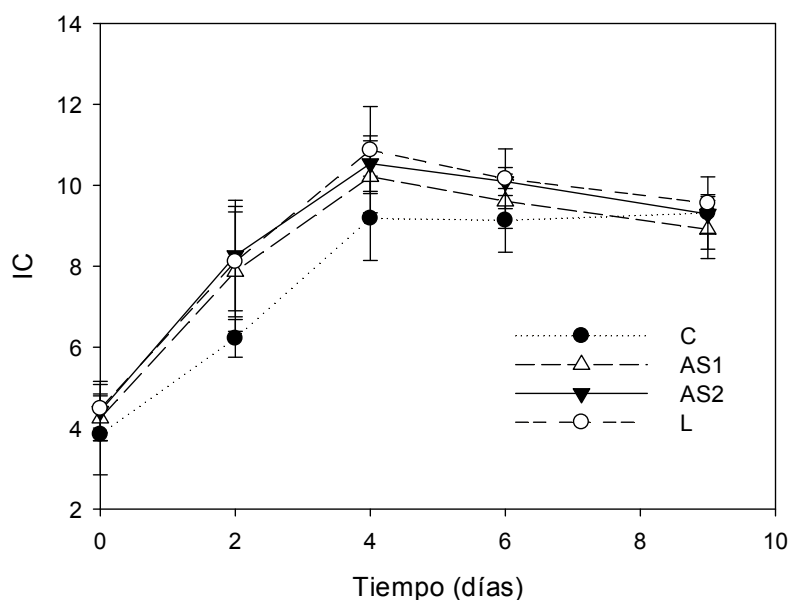


Figura 4.10. Evolución de la intensidad colorante en las vinificaciones en tinto durante los períodos de fermentación / maceración (días 0 al 5) y de maceración post-fermentativa (días 6 al 9)

Se encontraron diferencias significativas en la IC al segundo día de maceración/fermentación entre los vinos AS 2 y L comparando con los vinos control (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Intensidad colorante en las vinificaciones en tinto durante los períodos de fermentación/maceración (días 0 al 5) y de maceración post-fermentativa (días 6 al 9).

Día	Tratamiento	Intensidad Colorante (IC)
0	C	3.84 a \pm 0.99
	AS 1	4.24 a \pm 0.55
	AS 2	4.42 a \pm 0.73
	L	4.48 a \pm 0.59
2	C	6.22 b \pm 0.46
	AS 1	7.87 bc \pm 1.47
	AS 2	8.26 cd \pm 1.36
	L	8.11 cd \pm 1.36
4	C	9.18 cdef \pm 1.04
	AS 1	10.21 ef \pm 0.89
	AS 2	10.54 ef \pm 0.68
	L	10.87 f \pm 1.07
6	C	9.13 cde \pm 0.79
	AS 1	9.61 def \pm 0.67
	AS 2	10.09 ef \pm 0.34
	L	10.16 ef \pm 0.74
9	C	9.31 cdef \pm 0.89
	AS 1	8.91 cde \pm 0.72
	AS 2	9.29 cdef \pm 0.48
	L	9.55 cdef \pm 0.17

Los valores corresponden a la media de tres vinificaciones réplica \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según test LSD ($p < 0.02$). C: control sin agregado de enzimas; AS 1: PP-AS (0.045 g / 3.0 L); AS 2: PP-AS (0.090 g / 3.0 L); L: preparado comercial (0.090 g / 3.0 L).

Si bien la IC de los vinos tratados con enzimas fue mayor que la de los vinos control prácticamente durante todo el proceso, estas diferencias fueron disminuyendo durante los cuatro días adicionales del período de maceración post-

fermentativa (día 6 al 9), en el que el vino se mantuvo en contacto con los hollejos de la uva y las lías. La progresión de la fermentación alcohólica trae consigo un incremento en la concentración de etanol, lo cual, junto con el período de maceración post-fermentativa, permite la extracción de polifenoles y de color [Casassa et al., 2013] y puede dar cuenta del incremento progresivo de la IC de los vinos control durante el período post-fermentativo de maceración. Las vinificaciones suplementadas con enzimas (AS 1, AS 2 y L) alcanzaron sus valores más elevados de IC al final de la fermentación alcohólica y la extensión del período de maceración no mejoró la extracción de color. Bautista-Ortín et al. [2005] obtuvieron resultados similares, encontrando que las mayores diferencias entre los vinos tratados con enzimas y los vinos control se daban al tercer día desde su adición, tiempo después del cual estas diferencias se hacían más pequeñas, llegando en algunos casos a no ser significativas.

El comportamiento de la IC durante la maceración/fermentación fue más bien similar en todas las vinificaciones tratadas con enzimas, mostrando un incremento sustancial durante la primer parte seguido de una ligera caída evidenciada a medida que se avanza hacia el final del proceso. Los principales polifenoles responsables del incremento en la IC observado durante la fermentación/maceración son las antocianinas, pigmentos que normalmente decaen a lo largo del proceso [Fulcrand et al., 2006], en parte debido a que experimentan reacciones de hidrólisis, oxidación y polimerización, en parte porque precipitan junto con las lías ya que se adhieren a levaduras y hollejos [Salmon et al., 2002].

En resumen, los resultados correspondientes a este apartado muestran que los vinos tratados con enzimas alcanzaron valores máximos de IC al final de la fermentación alcohólica por lo que no habría sido necesario el período post-fermentativo de maceración, mientras que en el caso de los vinos control fue durante la maceración extendida cuando alcanzaron sus valores máximos de IC. Así, puede decirse que las enzimas presentes tanto en PP-AS como en el preparado comercial promovieron una extracción de antocianinas más rápida en comparación con la maceración sin el agregado de enzimas.

Composición final de los vinos tintos

La Tabla 4.5 presenta la composición general de los vinos tintos en términos de sus parámetros enológicos. Los niveles de azúcares reductores residuales de

los vinos AS 2 suplementados con 0.030 g/L de PP-AS fueron significativamente menores en comparación con los demás vinos y casi la mitad del valor comparando con los vinos control sin el agregado de enzimas; de acuerdo a estos valores, los vinos tintos pueden clasificarse como “secos”. Tal como se discutió para el caso de los vinos blancos, la concentración de azúcar residual normal en vinos se encuentra en el orden de 1-2 g/L, y las diferencias observadas entre los distintos vinos tintos, si bien significativas estadísticamente, son pequeñas y en principio no pueden ser explicadas ni relacionadas con los tratamientos enzimáticos. Los demás parámetros enológicos determinados fueron similares en todos los vinos con la excepción del etanol, cuyos niveles en los vinos AS 2 fueron levemente superiores que en los demás vinos.

Tabla 4.5. Parámetros enológicos de los vinos tintos elaborados

	C	AS 1	AS 2	L
Azúcares reductores (g/L)	2.37a±0.12	2.37a±0.05	1.23c±0.05	2.09b±0.07
pH	3.86ab±0.01	3.86ab±0.00	3.89b±0.02	3.83a±0.01
Acidez total ^a (g/L)	4.6a±0.1	4.5a±0.1	4.5a±0.2	4.7a±0.1
Acidez volátil ^b (g/L)	0.07a±0.02	0.06a±0.01	0.05a±0.01	0.07a±0.00
Grado alcohólico (% a 20° C)	12.4a±0.06	12.5a±0.10	12.7a±0.06	12.4a±0.10
SO ₂ libre (mg/L)	<30.0	<30.0	<30.0	<30.0
SO ₂ total (mg/L)	<60.0	<60.0	<60.0	<60.0
Ácido L-málico (g/L)	1.48a±0.09	1.63a±0.06	1.69a±0.11	1.67a±0.10
Ácido L-láctico (g/L)	0.22a±0.06	0.29a±0.07	0.30a±0.03	0.23a±0.08

Determinaciones realizadas dentro de la semana previa al embotellado. ^aExpresado como ácido tartárico, ^b Expresado como ácido acético. Valores correspondientes a las medias de tres vinificaciones réplica ± desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según test LSD ($p < 0.02$).

Todos los parámetros resultaron normales y por debajo de los límites máximos permitidos. En el caso del ácido L-láctico, además de ser los valores de

los vinos elaborados similares entre sí, también lo fueron respecto del mosto de uva tinta, cuya concentración de ácido L-láctico previa a la fermentación alcohólica fue de 0.25 g/L, con lo cual al momento del embotellado ningún vino tinto habría experimentado fermentación maloláctica.

A su vez, al momento del embotellado se analizaron las características cromáticas de los vinos elaborados (Tabla 4.6). No se encontraron diferencias significativas en el IPT o la IC entre ninguno de los vinos tintos, resultados que están en sintonía con los obtenidos durante la maceración post-fermentativa, en donde se observa que las diferencias en la IC al final de este período entre los distintos vinos elaborados dejan de ser significativas (Tabla 4.4). Respecto de los parámetros CIELab, según Martínez et al. [2001] valores de $\Delta E^* \geq 2.7$ permiten al ojo humano detectar diferencias de color entre dos vinos, analizados visualmente en copas de cata estandarizadas. Por lo tanto, observando los valores presentados en la Tabla 4.6 se concluye que no se aprecian diferencias significativas perceptibles a la vista entre los distintos vinos tintos elaborados.

Tabla 4.6. Composición cromática de los vinos tintos al momento de embotellado

	C	AS 1	AS 2	L
IC	4.84a \pm 0.29	4.72a \pm 0.29	5.08a \pm 0.18	5.08a \pm 0.19
IPT	28.10a \pm 2.41	26.36a \pm 1.54	28.42a \pm 0.83	28.98a \pm 1.42
$\Delta E^*_{x,c^a}$	-	1.51	0.32	0.84

^aIndica diferencias de color entre los vinos control y los demás vinos. Valores correspondientes a las medias de tres vinificaciones réplica \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según test LSD ($p < 0.02$).

Composición fenólica y aminoacídica de los vinos tintos

Con el objetivo de determinar la eficiencia de extracción de los componentes desde los hollejos al vino tinto, se realizó un análisis de las antocianinas y de los compuestos fenólicos no antocianínicos. La identificación de cada uno de estos compuestos se basó en los tiempos de retención [Ginjom et al., 2011] y en la comparación frente a patrones de referencia. Las antocianinas son los compuestos responsables del color, uno de los principales atributos de calidad del vino, y de otras características organolépticas como amargor o astringencia. Se identificaron y cuantificaron nueve antocianinas por HPLC de fase reversa (Fig. 4.11 y Tabla 4.7), siendo la principal la malvidina-3-glucósido, en concordancia

Tabla 4.7. Contenido (mg/L) de polifenoles, aminoácidos y aminas biogénicas de los vinos tintos.

	C	AS1	AS2	L
Antocianinas				
Delfinidina-3-glucósido	2.04a ± 0.11	1.97a ± 0.07	2.03a ± 0.08	1.98a ± 0.08
Cianidina-3-glucósido	2.62a ± 0.18	2.55a ± 0.12	2.58a ± 0.12	2.45a ± 0.09
Petunidina-3-glucósido	1.68a ± 0.01	1.69a ± 0.02	1.68a ± 0.01	1.66a ± 0.01
Peonidina-3-glucósido	1.98a ± 0.26	1.80a ± 0.07	1.80a ± 0.02	1.73a ± 0.02
Malvidina-3-glucósido	13.74ab ± 1.49	14.14b ± 1.39	13.49ab ± 0.67	11.90a ± 0.37
Peonidina-3-acetilglucósido	1.75a ± 0.01	1.73a ± 0.01	1.74a ± 0.03	1.76a ± 0.04
Malvidina-3-acetilglucósido	2.18a ± 0.05	1.88a ± 0.40	2.15a ± 0.10	2.22a ± 0.04
Peonidina-3-cumaroilglucósido	2.01ab ± 0.01	2.05b ± 0.06	1.98ab ± 0.06	1.94a ± 0.04
Malvidina-3-cumaroilglucósido	2.05ab ± 0.09	2.08b ± 0.11	1.99ab ± 0.02	1.92a ± 0.03
Fracción no antocianínica				
Ácido gálico	7.69a ± 4.07	9.40a ± 1.59	11.21a ± 5.40	12.12a ± 6.04
Catequina	4.66a ± 1.41	3.38a ± 0.55	4.03a ± 0.37	3.28a ± 0.88
Ácido cafeico	5.00a ± 1.24	5.73ab ± 1.42	8.85b ± 2.71	5.70ab ± 0.78
Ácido cumárico	4.67a ± 0.56	5.52ab ± 0.20	6.38b ± 0.91	4.22a ± 0.79
Quercetina	1.93a ± 0.03	1.96a ± 0.01	2.06a ± 0.16	1.94a ± 0.01
Aminoácidos				
Ácido aspártico	12.69a ± 0.50	8.56a ± 2.13	18.41b ± 5.59	8.92a ± 0.98
Ácido glutámico	40.13a ± 0.31	36.48a ± 1.26	32.14a ± 10.75	34.05a ± 0.16
Serina	2.02ab ± 0.29	1.58a ± 0.06	2.06b ± 0.42	nd
Glicina	15.26ab ± 0.20	14.28a ± 0.26	18.35b ± 3.65	13.97a ± 1.14
Treonina	6.35a ± 0.14	9.20a ± 5.91	6.68a ± 0.54	5.02a ± 0.67
Prolina	316.21a ± 18.51	265.24a ± 49.44	494.85b ± 179.24	276.16a ± 1.50
Valina	12.10a ± 1.18	11.13a ± 1.29	12.84a ± 1.57	11.60a ± 0.47
Triptofano	7.13ab ± 0.25	7.37ab ± 1.13	8.33b ± 1.41	6.17a ± 0.10
Leucina	3.09ab ± 0.04	2.53a ± 0.35	3.70b ± 0.75	2.46a ± 0.12
Ornitina	18.34a ± 1.76	17.27a ± 0.19	19.66a ± 0.67	13.72a ± 4.36
Lisina	15.41ab ± 0.27	14.10a ± 0.61	17.35b ± 2.36	14.08a ± 0.20
Aminas biogénicas				
GABA	33.89ab ± 1.91	31.81ab ± 2.39	36.80b ± 4.94	29.01a ± 1.35
Putrescina	3.72a ± 0.66	2.84a ± 0.25	4.93a ± 0.09	7.20a ± 5.99
Espermidina	5.49a ± 0.37	5.43a ± 0.26	8.03a ± 0.46	5.77a ± 0.68

Valores correspondientes a las medias de tres vinificaciones réplica ± desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas según test LSD ($p < 0.05$). nd: no detectado.

con la mayoría de los estudios de este tipo realizados a vinos de *V. vinífera* (“Cabernet Sauvignon”, “Shiraz”, “Merlot”, “Graciano”, “Tempranillo”) [Ginjom et al., 2011]. Otras antocianinas derivadas de la malvidina – cumaroilglucósido y acetilglucósido – también se hallaron en todos los vinos, tal y como se reportó previamente [Ginjom et al., 2011]. La segunda antocianina en abundancia fue la cianidina-3-glucósido, seguida de los glucósidos, cumaroilglucósidos y acetilglucósidos derivados de otras antocianidinas (delfinidina, peonidina y petunidina), las cuales se encuentran comúnmente en vinos tintos [Flamini et al., 2013].

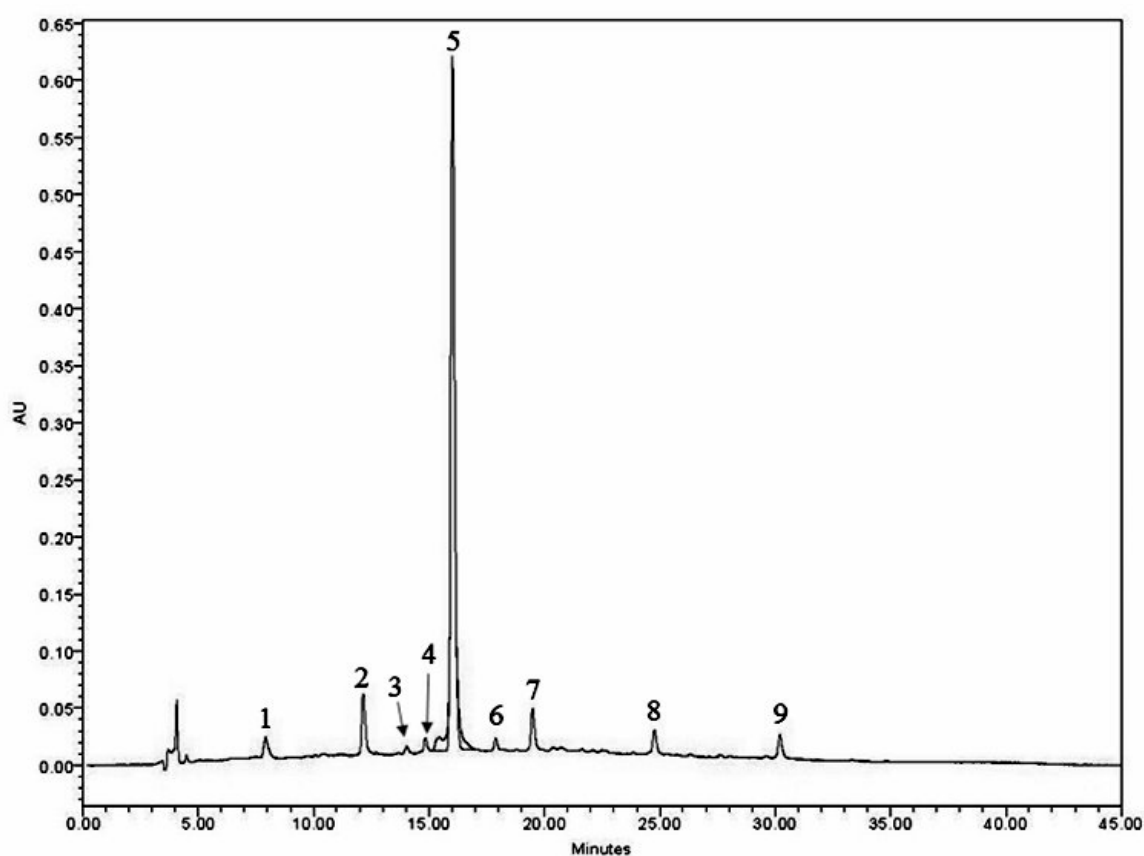


Figura 4.11. Cromatograma correspondiente a las antocianinas determinadas en vinos tintos por HPLC a 520 nm: 1, delfinidina-3-glucósido; 2, cianidina-3-glucósido; 3, petunidina-3-glucósido; 4, peonidina-3-glucósido; 5, malvidina-3-glucósido; 6, peonidina-3-acetilglucósido; 7, malvidina-3-acetilglucósido; 8, peonidina-3-cumaroilglucósido; 9, malvidina-3-cumaroilglucósido.

Respecto de la fracción no antocianínica cuantificada (Tabla 4.7), el compuesto mayoritario fue ácido gálico, el cual surge de la hidrólisis de ésteres de galatos de taninos presentes en las semillas de las uvas y ha sido reportado como

un ácido benzoico fácilmente visible por análisis cromatográficos en vinos tintos añejados [Waterhouse, 2002]. Entre los ácidos hidroxycinámicos, los ácidos cafeico y cumárico fueron los presentes mayoritariamente, como era de esperarse por ser éstos y sus ésteres correspondientes compuestos ubicuos en tejidos de plantas y frutas [Waterhouse, 2002].

En la Tabla 4.7 puede observarse que la concentración de los ácidos cafeico y cumárico de los vinos AS 2 (suplementados con 0.030 g/L de PP-AS) fueron significativamente más elevados que los de los vinos control sin adición de enzimas. Los valores cuantificados de ácido cafeico, 8.85 mg/L, y ácido cumárico, 6.38 mg/L, se encuentran dentro del rango de concentraciones reportadas en vinos tintos europeos (0.30 - 3.8 mg/L para ácido cafeico y 0.30 - 14.19 mg/L para ácido cumárico) y brasileños (3.59 - 10.45 mg/L para ácido cafeico y 0.30 - 7.83 mg/L para ácido cumárico) sin malos olores que indiquen algún tipo de deterioro [Dias et al., 2016]. El incremento significativo de estos compuestos en los vinos AS 2 respecto de los vinos control apunta a que las actividades enzimáticas de PP-AS habrían contribuido, al menos ligeramente, en facilitar la liberación del ácido cumárico y cafeico, contenidos en la piel de las uvas. Los otros dos flavonoides no antocianínicos cuantificados en los vinos tintos fueron quercetina y catequina, cuyas concentraciones fueron menores que los valores de los tres ácidos fenólicos discutidos anteriormente. Estos resultados concuerdan con reportes previos que demuestran que las preparaciones pectolíticas facilitan la liberación de compuestos fenólicos desde la piel de la uva al vino mediante la degradación de la fracción péctica de las paredes celulares [Romero-Cascales et al., 2012].

Se analizó también el contenido de aminoácidos de los vinos elaborados para determinar la existencia de diferencias, contra los vinos control, que reflejasen una disrupción diferencial de células de la piel y de la pulpa de las uvas. La Fig. 4.12 muestra el cromatograma de las aminoenonas derivadas de aminoácidos y aminas biogénicas identificadas a 280 nm por HPLC. El aminoácido más abundante detectado en todos los vinos fue la prolina, con valores que oscilaron entre 265 y 495 mg/L (Tabla 4.7), lo cual se explica por el hecho de que *S. cerevisiae* es incapaz de utilizar prolina [Pinu et al., 2014]. En orden decreciente el siguiente aminoácido fue el ácido glutámico, con valores medios alcanzando 40.13 mg/L, seguido de GABA, con 36.8 mg/L. Los demás aminoácidos presentaron valores medios menores que 18.4 mg/L, con la excepción de la ornitina, con concentraciones en el rango de 13.72 – 19.66 mg/L, y el ácido

aspártico, cuyas concentraciones en el caso de los vinos AS 2 (18.41 mg/L) fueron significativamente mayores que en los demás vinos.

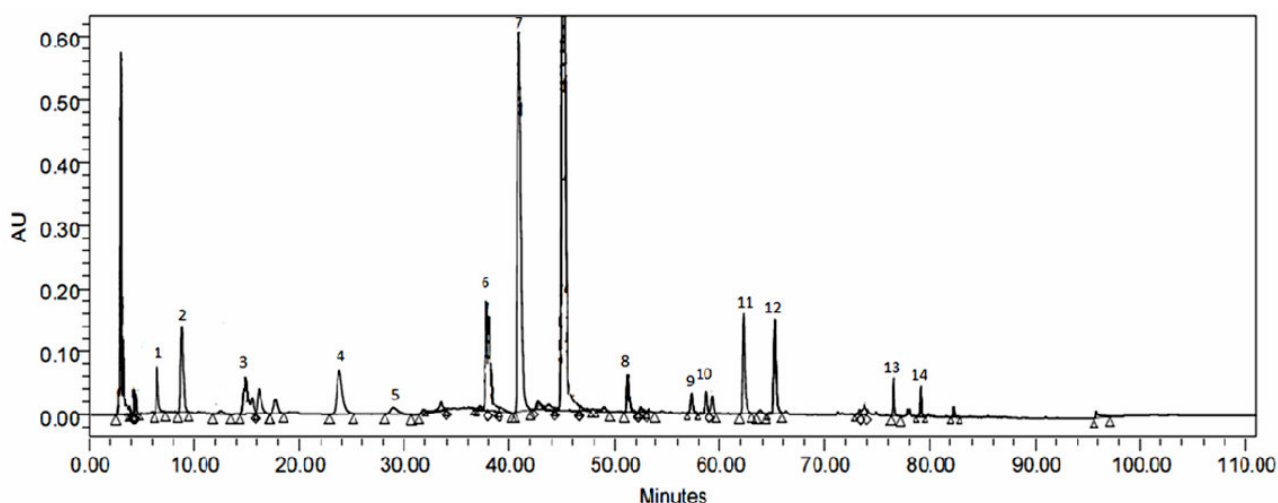


Figura 4.12. Cromatograma correspondiente a los aminoácidos y aminas biogénicas, determinados como sus derivados aminoenónicos respectivos por HPLC: 1, ácido aspártico; 2, ácido glutámico; 3, ácido aminoadípico; 4, glicina; 5, treonina; 6, GABA; 7, prolina; 8, valina; 9, triptofano; 10, leucina; 11, ornitina; 12, lisina; 13, putrescina; 14, espermidina.

Los resultados de los análisis de aminoácidos y compuestos fenólicos por HPLC apuntan a que las actividades enzimáticas presentes en PP-AS ayudan a liberar no sólo las moléculas asociadas a la fracción celular de la piel de las uvas, sino también compuestos contenidos dentro de las células mediante la degradación de sustancias pécticas de las paredes celulares y láminas medias durante el macerado. Con el fin de resaltar las diferencias presentes en los distintos vinos tintos elaborados, todos los datos derivados de los análisis por HPLC fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 4.13).

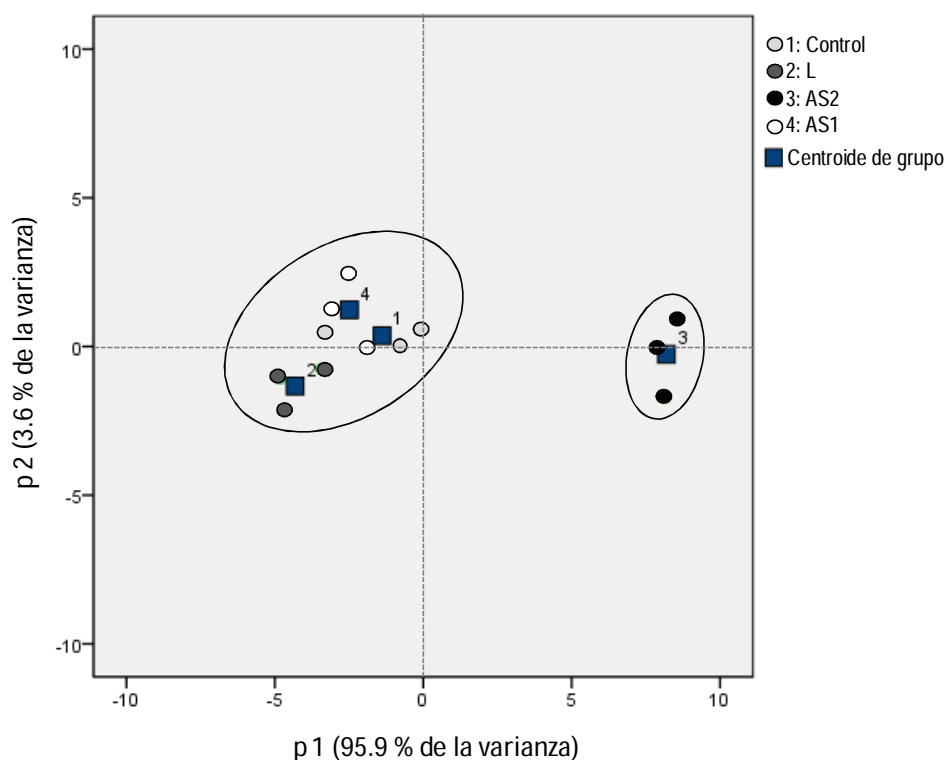


Figura 4.13. Representación gráfica de los componentes 1 y 2 del PCA para todas las determinaciones por HPLC realizadas a los vinos tintos elaborados.

La gráfica correspondiente al PCA muestra que los vinos AS 2 agruparon en forma diferencial respecto de los demás, posicionándose en el extremo derecho del eje x. Dicho eje representa al componente 1, que representa el 95.9 % de la varianza total; el lado derecho de este eje es caracterizado por la concentración de los ácidos cafeico y cumárico. Por ende, mediante el PCA puede decirse que los vinos AS 2, suplementados con la mayor dosis de PP-AS, resultaron significativamente diferentes respecto de los demás vinos, fundamentalmente debido a sus concentraciones de ácidos cafeico y cumárico, las cuales fueron más elevadas que en sus contrapartes, y posiblemente reflejen una mayor extracción de los componentes celulares de la uva hacia el vino.

Conclusiones

De acuerdo al análisis de las actividades enzimáticas del preparado PP-AS de *A. sojae*, ensayadas en condiciones similares a las que ocurren en vinificaciones, la actividad PGasa fue la mayoritaria, como era de esperarse. El preparado

presentó también actividad XYLasa, útil en aplicaciones enológicas, y mostró estar libre de actividad pectinesterasa en las condiciones de ensayo. En comparación con un preparado pectolítico comercial de Lallemand, este último presentó una menor actividad PGasa frente a APG, mostró actividad pectinesterasa y exhibió otras actividades de interés tales como endo-glucanasa y β -glucosidasa, además de XYLasa.

Los mostos de uva blanca adicionados con PP-AS experimentaron, a partir de las 24 horas de comenzado el tratamiento de clarificación, un marcado descenso de turbidez respecto de los mostos sin tratar con enzimas. Pasadas 36 horas, los mostos suplementados con la dosis más alta de PP-AS, 0.0105 g/L de mosto, alcanzaron una turbidez media de 151 NTU, valor dentro del rango óptimo para su utilización en la elaboración de vinos blancos finos de calidad. Al final del proceso de vinificación, la conservación de los niveles de ácido L-málico en los vinos blancos elaborados a partir de los mostos clarificados con PP-AS y con el preparado comercial fue significativamente mayor que en caso de los vinos control, los cuales presentaron un nivel comparativamente mayor de ácido L-láctico a expensas de la metabolización del ácido L-málico. La conservación de ácido L-málico es un aspecto positivo para la elaboración una gran proporción de vinos blancos, con características de frescor proporcionadas por este compuesto y que buscan expresar aromas varietales afrutados que suelen aplacarse con la fermentación maloláctica. Este resultado es atribuible a un desfangado eficaz gracias a la adición de enzimas pectolíticas, ya que durante la clarificación la carga microbiana disminuye sensiblemente y los mostos desfangados son menos proclives de sufrir fermentaciones indeseadas.

En las vinificaciones en tinto, la aplicación de PP-AS durante la etapa de maceración fermentativa promovió una extracción de materia colorante más rápidamente que en el caso de los vinos control sin la adición de enzimas. El análisis por HPLC de la composición fenólica y aminoacídica de los vinos elaborados reveló un contenido de ácidos cafeico, cumárico y aspártico mayor en los vinos producidos con la dosis más alta de PP-AS, 0.030 g/L, consistente con una extracción mejorada de los componentes de las células de la uva por la acción catalítica de las enzimas presentes en PP-AS.

Comparando la aplicación de PP-AS en vinificaciones en blanco y en tinto, los efectos son más marcados y claramente apreciables en las primeras, mientras que en las últimas las diferencias son, tal vez, más sutiles. Esto es atribuible a una matriz mucho más compleja en el caso de las vinificaciones en tinto, en

donde el agregado de enzimas se realiza a una pasta constituida por piel y semillas, además de jugo de uva, y se espera que la acción de los biocatalizadores ocurra en parte durante la fase de crecimiento exponencial de las levaduras, lo cual trae aparejada la producción de etanol que tiende a enmascarar cualquier diferencia debida a la maceración enzimática. Ambos resultados apuntan a una cuestión de dosis, o cantidades. Por un lado, mediante un ajuste de las cantidades de PP-AS a agregar al mosto de uva blanca, es posible obtener mayores niveles de clarificación en tiempos menores de tratamiento, siempre teniendo en cuenta que la temperatura del mosto es clave al momento de calcular la dosis adecuada. Por otro lado, se espera que una dosis mayor de PP-AS durante las vinificaciones en tinto acentúe el efecto de la acción de la actividad PGasa y de las demás actividades accesorias de *A. sojae* durante la maceración fermentativa y en el producto final.

Referencias bibliográficas

- Ancín C, Ayestarán B, Corroza M, Garrido J, González A (1996) Influence of prefermentation clarification on the higher alcohol contents of wines. *Food Chem* **55**:241 – 249.
- Bautista-Ortín AB, Martínez-Cutillas A, Ros-García JM, López-Roca JM, Gómez-Plaza E (2005) Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *Int J Food Sci Technol* **40**:867– 878.
- BeMiller JN, Kumari GV (1972) beta-Elimination in uronic acids: evidence for an ElcB mechanism. *Carbohydr Res* **25**:419 – 428.
- Brossaud F, Noble AC, Cheynier V (2001) Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Aust J Grape Wine Res* **7**:33 – 39.
- Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF (eds) (1999) Principles and Practices of Winemaking. Chapman & Hall.
- Busse-Valverde N, Gómez-Plaza E, López-Roca JM, Gil-Muñoz R, Bautista-Ortín AB (2011) The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique. *J Agric Food Chem* **59**:5450 – 5455.
- Casassa FL, Beaver CW, Mireles MS, Harbertson JF (2013) Effect of extended maceration and ethanol concentration on the extraction and evolution of phenolics, colour components and sensory attributes of Merlot wines. *Aust J Grape Wine Res* **19**:25 – 39.

- Conde C, Silva P, Fontes N, Dias AC, Tavares RM, Sousa MJ, Agasse A, Delrot S, Geros H (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* **1**:1 – 22.
- Dias FS, David JM, David JP (2016) Determination of phenolic acids and quercetin in Brazilian red wines from Vale do São Francisco region using liquid-liquid ultrasound-assisted extraction and HPLC-DAD-MS. *J Braz Chem Soc* **27**:1055 – 1059.
- Dubernet M, Ribéreau-Gayon P (1974) Causes et conséquences de la consommation de l'oxygène par les moûts de raisin. *Vitis* **13**:233 – 244.
- Ducasse MA, Williams P, Canal-Llauberes RM, Mazerolles G, Cheynier V, Doco T (2011) Effect of macerating enzymes on the oligosaccharide profiles of Merlot red wines. *J Agric Food Chem* **59**:6558 – 6567.
- Du Toit WJ, Marais J, Pretorius IS, Du Toit M (2006) Oxygen in must and wine: A review. *S Afr J Enol Vitic* **27**:76 – 94.
- Fia G, Canuti V, Rosi I (2014) Evaluation of potential side activities of commercial enzyme preparations used in winemaking. *Int J Food Sci Technol* **49**:1902 – 1911.
- Flamini R, Mattivi F, De Rosso M, Arapitsas P, Bavaresco L (2013) Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *Int J Mol Sci* **14**:19651 – 19669.
- Gao Y, Fangel JU, Willats WG, Vivier MA, Moore JP (2016) Dissecting the polysaccharide-rich grape cell wall matrix using recombinant pectinases during winemaking. *Carbohydr Polym* **152**:510 – 519.
- Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* **59**:257 – 268.
- Ginjom I, D'Arcy B, Caffin N, Gidley MI (2011) Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. *Food Chem* **125**:823 – 834.
- Gómez-Alonso S, Hermosín-Gutiérrez I, García-Romero E (2007) Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *J Agric Food Chem* **55**:608 – 613.
- Gögüs N, Tari C, Oncü S, Unluturk S, Tokatli F (2006) Relationship between morphology, rheology and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 in submerged cultures. *Biochem Eng J* **32**:171 – 178.
- Guérin L, Sutter DH, Demois A, Chereau M, Trandafir G (2009) Determination of activity profiles of the main commercial enzyme preparations used in winemaking. *Am J Enol Vitic* **60**:322 – 331.
- Henschke PA, Jiranek V (1993) Yeast metabolism of nitrogen compounds, pp77-165. In: Fleet GH (ed) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers Chur.

- Joutei AK, Ouazzani Chahdi F, Bouya D, Saucier C, Glories Y (2003) Electronic microscopy examination of the influence of purified enzymatic activities on grape skin cell wall. *J Int Sci Vigne Vin* **37**:23 – 30.
- Lavigne-Cruège V (1996) Recherches sur les composés volatils soufrés formés par la levure au cours de la vinification et de l'élevage des vins blancs secs. Tesis doctoral, Université de Bordeaux II.
- López Martín R, Santamaría Aquilué P, Epifanio S, Garijo P, Gutiérrez AR (2004) La adición de materia nitrogenada al mosto de uva. *Zubía Monográfico* **16-17**:83 – 92.
- Losada MM, Andrés J, Cacho J, Revilla E, López JF (2011) Influence of some prefermentative treatments on aroma composition and sensory evaluation of white Godello wines. *Food Chem* **125**:884 – 891.
- Martín, MC, Morata de Ambrosini VI (2014) Effect of a cold-active pectinolytic system on colour development of Malbec red wines elaborated at low temperature. *Int J Food Sci Technol* **49**:1893–1901.
- Martínez JA, Melgosa M, Pérez MM, Hita E, Negueruela AI (2001) Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Sci Technol Int* **7**:439–444.
- Merín MG, Morata de Ambrosini VI (2015) Highly cold-active pectinases under wine-like conditions from non-Saccharomyces yeasts for enzymatic production during winemaking. *Lett Appl Microbiol* **60**:467 – 474.
- Moreno-Arribas MV, Polo MC (2009) Wine Chemistry and Biochemistry 1st ed Springer. New York, USA.
- Nelson N (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* **153**:375 – 380.
- OIV (2014) In: Récueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts. Bull OIV (Off. Int Vigne Vin), Paris, France.
- Ollivier C, Stonestreet T, Larue F, Dubourdieu D (1987) *Conn Vigne Vin* **21**:59 – 70.
- Pinu FR, Edwards PJ, Gardner RC, Villas-Boas SG (2014) Nitrogen and carbon assimilation by *Saccharomyces cerevisiae* during Sauvignon blanc juice fermentation. *FEMS Yeast Res* **14**:1206 – 1222.
- Registro de viñedos y superficies 2016 – Instituto Nacional de Vitivinicultura (2017) http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/anuarios/2016/REGISTRO_VDOS__WEB__2016_2.pdf
- Revilla I, González-San José ML (2003) Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *Int J Food Sci Technol* **38**:29 – 36.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A (eds) (2006) Handbook of enology, the microbiology of wine and vinifications (vol 1). John Wiley & Sons.

- Robins SL, Angell M, Kumas V (1981) Basic Pathology 3rd ed. WB. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Romero-Cascales I, Fernández-Fernández JI, Ros-García JM, López-Roca JM, Gómez-Plaza E (2008) Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. *Int J Food Sci Technol* **43**:1295 –1305.
- Romero-Cascales I, Ros-García JM, López-Roca JM, Gómez-Plaza E (2012) The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. *Food Chem* **130**:626 –631.
- Santos-Buelga C, De Freitas V (2009) Influence of phenolics on wine organoleptic properties, pp529-570. In: Moreno-Arribas MV, Polo MC (eds) Wine chemistry and biochemistry. Springer, New York, USA.
- Shively CE, Henick-Kling T (2001) Comparison of two procedures for assay of free amino nitrogen. *Am J Enol Vitic* **52**:400 – 401.
- Styger G, Prior B, Bauer FF (2011) Wine flavor and aroma. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**:1145 – 1159.
- Somogyi M (1952) Notes on sugar determination. *J Biol Chem* **195**:19 – 23.
- Takayanagi T, Uchibori T, Yokotsuka K (2001) Characteristics of yeast polygalacturonases induced during fermentation on grape skins. *Am J Enol Vitic* **52**:41 – 44.
- Van Rensburg P, Pretorius IS (2000) Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations-A review. *S Afr J Enol Vitic* **21**:52 –73.
- Velázquez-Estrada RM, Hernández-Herrero MM, Guamis-López B, Roig-Sagués AX (2012) Impact of ultra high pressure homogenization on pectin methylesterase activity and microbial characteristics of orange juice: A comparative study against conventional heat pasteurization. *Innovative Food Sci Emerging Technol* **13**:100 – 106.
- Vita CE, Contreras-Esquivel JC, Voget CE (2009) Pectolytic enzymes of the industrial fungus *Aspergillus kawachii*. *Food Sci Biotechnol* **18**:1365 –1370.
- Waterhouse AL (2002) Wine phenolics. *Ann NY Acad Sci* **957**:21 –36.
- Wightman JD, Wrolstad RE (1996) Beta-glucosidase activity in juice-processing enzymes based on anthocyanin analysis. *J Food Sci* **61**:544 –548.
- Zietsman AJ, Moore JP, Fangel JU, Willats WG, Trygg J, Vivier MA (2015a) Following the compositional changes of fresh grape skin cell walls during the fermentation process in the presence and absence of maceration enzymes. *J Agric Food Chem* **63**:2798 – 2810.
- Zietsman AJ, Moore JP, Fangel JU, Willats WG, Trygg J, Vivier MA (2015b) Profiling the hydrolysis of isolated grape berry skin cell walls by purified enzymes. *J Agric Food Chem* **63**:8267 – 8274.

Apéndice 1

Desarrollo de un análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica muy útil que facilita encontrar patrones en bases de datos de gran magnitud. A continuación se explicará cómo realizar un PCA empleando un programa estadístico, en este caso el STATISTICA 7.0.

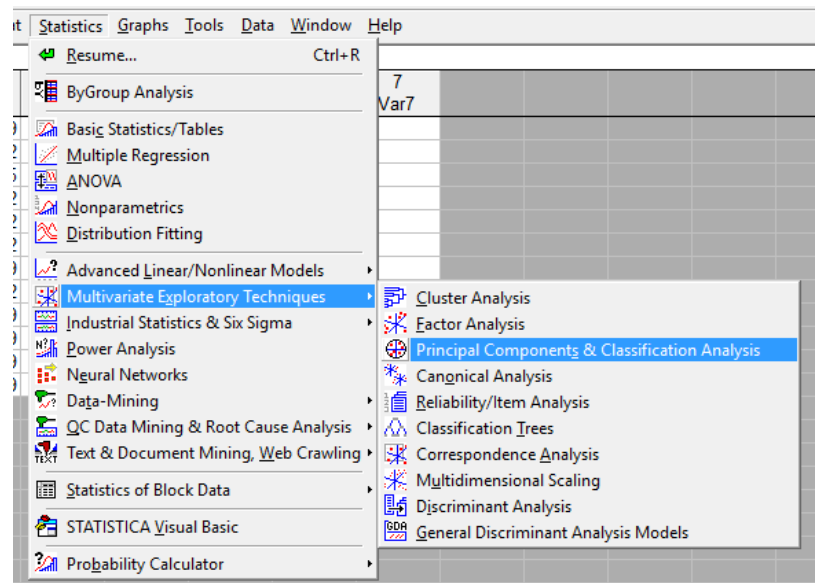
En el siguiente ejemplo se parte de una base de datos en donde una de las variables es categórica (Var7). Si la tabla que se muestra a continuación exhibiese los datos de las determinaciones de polifenoles y aminoácidos realizadas por HPLC a los vinos tintos, cada una de las variables (a excepción de la categórica) correspondería a un compuesto químico, mientras que cada uno de los casos correspondería a una determinación distinta. Por otro lado, la Var7 discrimina entre tratamientos, por ejemplo, los vinos control (A), los elaborados con el preparado enzimático comercial (B) y los elaborados con dos concentraciones diferentes el preparado de *A. sojae* (C y D). Como a partir de cada tratamiento se realizaron tres réplicas, cada letra aparece tres veces.

STATISTICA - [Data: Ejemplo PCA* (7v by 12c)]

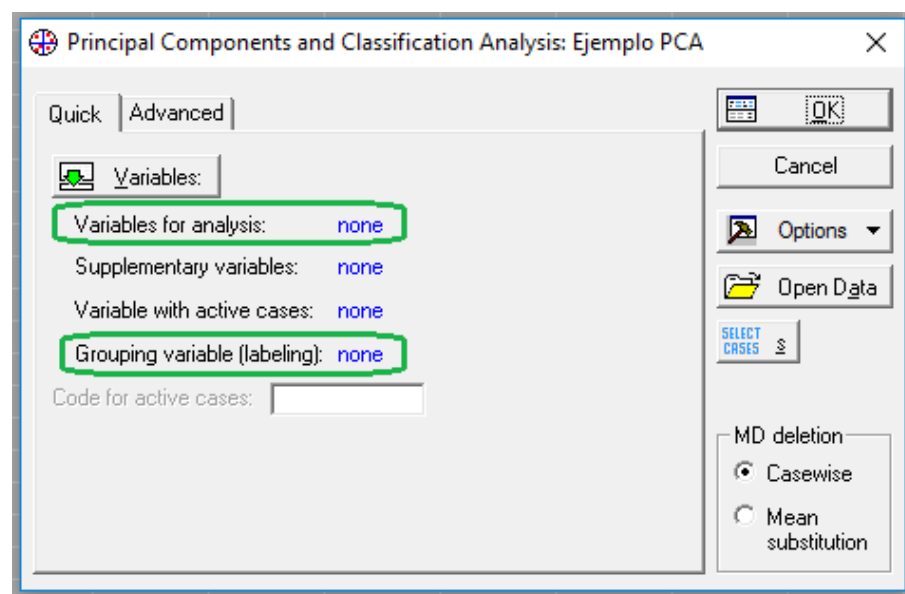
File Edit View Insert Format Statistics Graphs Tools Data Window Help

VARIABLES	1	2	3	4	5	6	7
CASOS	Var1	Var2	Var3	Var4	Var5	Var6	Var7
1	2,44	0,0549	4,65	3,85	1,512	0,1536	A
2	2,44	0,0732	4,425	3,86	1,374975	0,2672	A
3	2,228	0,0915	4,575	3,88	1,55925	0,2176	A
4	2,106	0,0732	4,6875	3,85	1,6065	0,1888	B
5	2,016	0,0732	4,65	3,83	1,63485	0,3264	B
6	2,152	0,0732	4,7625	3,82	1,78605	0,192	B
7	2,424	0,0549	4,5	3,86	1,573425	0,3072	C
8	2,344	0,0732	4,3875	3,86	1,620675	0,3472	C
9	2,344	0,0549	4,6125	3,86	1,69155	0,2112	C
10	1,256	0,0549	4,3875	3,9	1,59705	0,3264	D
11	1,256	0,0549	4,35	3,9	1,6632	0,2736	D
12	1,176	0,0549	4,65	3,86	1,80495	0,3024	D

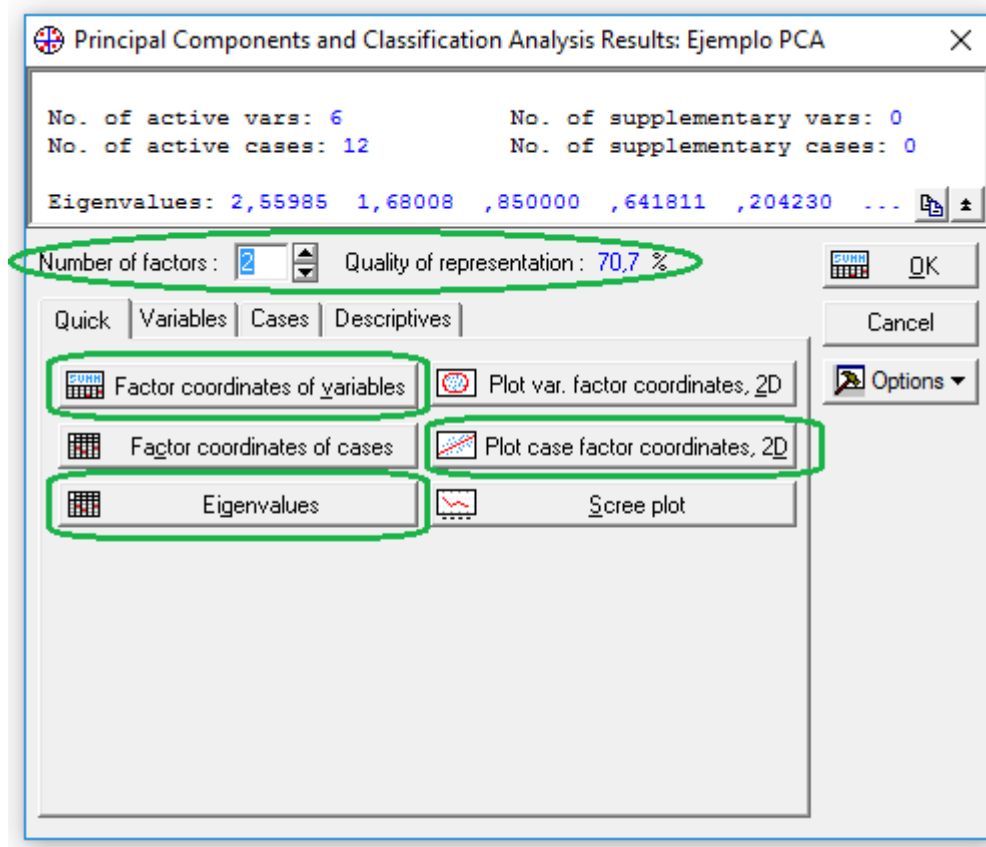
A continuación, en la barra de herramientas, seleccionar la pestaña “Statistics”. Se abrirá un menú desplegable, en el cual se debe seleccionar la opción “Multivariate Exploratory Techniques”, sub-opcion “Principal Components & Classification Analysis”:



Se desplegará un nuevo cuadro, en donde se seleccionarán las variables de interés y la variable de agrupamiento (variable categórica) en la opción “Variables” que aparece en la pestaña “Quick”:



Al seleccionar “Ok” en el cuadro anterior, se desplegará un nuevo cuadro con el resultado del análisis. Fijando el número de componentes en “2” se obtiene en este caso una calidad de representación del 70.7 %.



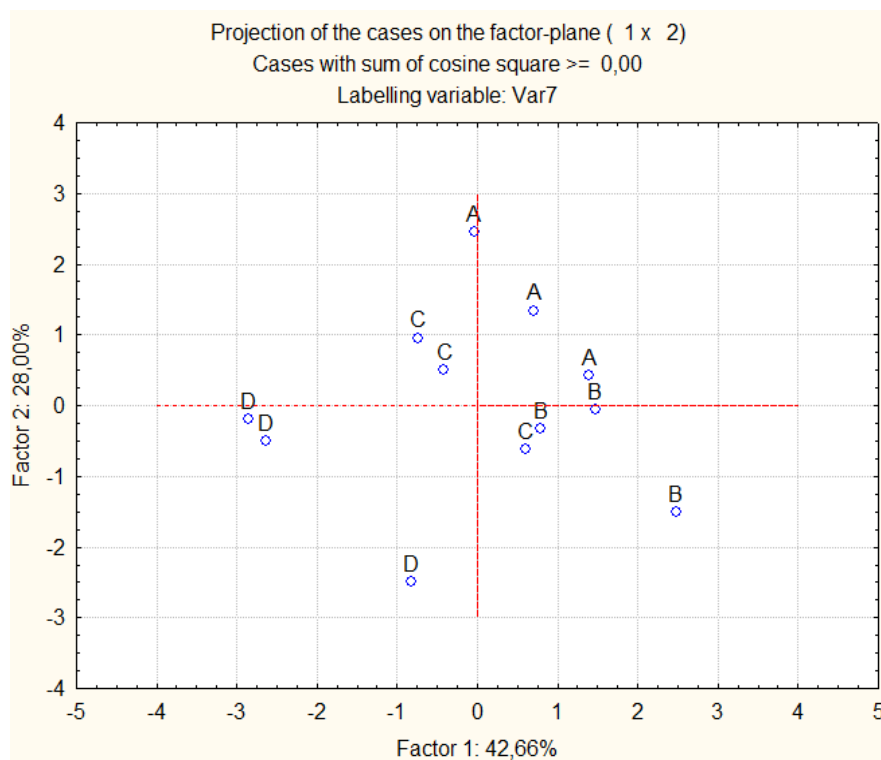
Al seleccionar “Eigenvalues”, se abre un cuadro en donde se observa que el primer componente explica un 42.66 % de la varianza total, mientras que el segundo componente explica un 28 %, y así sucesivamente.

Eigenvalues of correlation matrix, and related statistics (Ejemplo PCA)					
Active variables only					
Value number	Eigenvalue	% Total variance	Cumulative Eigenvalue	Cumulative %	
1	2,559848	42,66414	2,559848	42,6641	
2	1,680078	28,00131	4,239927	70,6654	
3	0,850000	14,16667	5,089927	84,8321	
4	0,641811	10,69686	5,731738	95,5290	
5	0,204230	3,40383	5,935968	98,9328	
6	0,064032	1,06719	6,000000	100,0000	

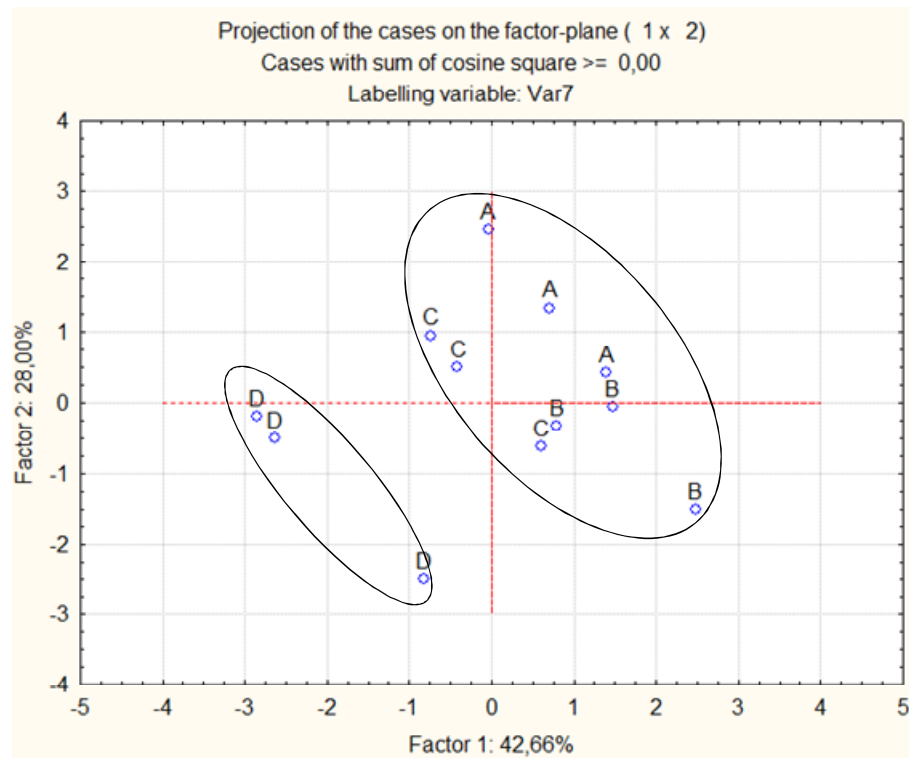
Si se selecciona “Factor coordinates of variables” se obtendrán las coordenadas bidimensionales de cada una de las variables en función de los 2 componentes a los que se les atribuye el mayor porcentaje de la varianza (Factor 1 y Factor 2). La magnitud correspondiente a cada variable da cuenta de la fuerza de correlación de dicha variable con cada Factor. Volviendo al caso analizado en la tesis, “Var3” y “Var4” podrían corresponder a “ácido cumárico” y “ácido cafeico”, ya que las coordenadas de dichas variables en la siguiente tabla respecto del Factor 1 son las de mayor magnitud.

Variable	Factor coordinates of the variables, based on correlations (Ejemplo PCA)	
	Factor 1	Factor 2
Var1	0,672559	0,603972
Var2	0,459665	0,441645
Var3	0,846170	-0,472358
Var4	-0,846887	0,191956
Var5	0,039818	-0,927393
Var6	-0,679274	0,014763

Al seleccionar “Plot case factor coordinates, 2D” se graficará la distribución de casos en función de los 2 componentes principales. El etiquetado corresponde a la variable de agrupamiento, en el caso del análisis de los vinos tintos, el tipo de tratamiento.



La delimitación de los conjuntos se le asigna al operador, de acuerdo a la temática bajo estudio. En este caso puede verse que el tratamiento D forma un conjunto en el cuadrante inferior izquierdo, separado del resto de los tratamientos:

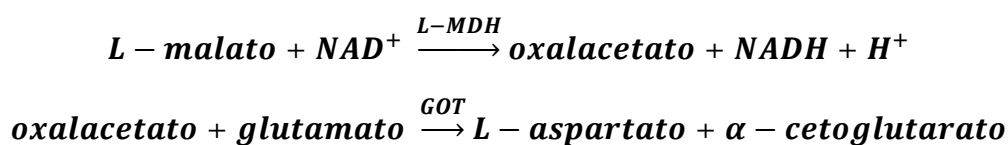


Apéndice 2

Fundamento teórico del análisis enzimático de los ácidos L-málico y L-láctico

Determinación de ácido L-málico

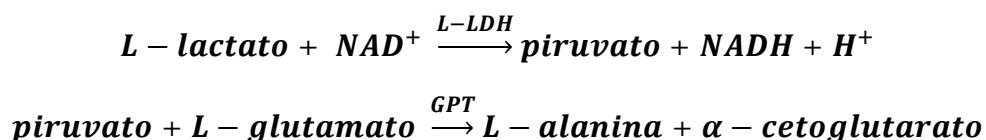
El ácido málico (L-malato) es oxidado por la enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH) en presencia NAD^+ a oxalacetato. El equilibrio de esta reacción está fuertemente desplazado hacia el malato. Si se elimina el oxalacetato del sistema de reacción, el equilibrio se desplaza hacia el oxalacetato. El oxalacetato se convierte, por acción de la enzima glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) y en presencia del L-glutamato, en L-aspartato:



La cantidad de NADH formada es estequiométricamente igual a la concentración de L-malato. El NADH se cuantifica por su absorbancia a 340 nm.

Determinación de ácido L-láctico

El ácido L-láctico (L-lactato) es oxidado por la enzima L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) en presencia de NAD^+ a piruvato. El equilibrio de esta reacción está casi totalmente desplazado hacia el lado del L-lactato. Sin embargo, transformando el piruvato por la enzima glutamato piruvato transaminasa (GPT) en presencia de de L-glutamato y L-alanina, el equilibrio se desplaza a favor del piruvato y NADH.



La cantidad de NADH formado en la reacción es igual a la cantidad de ácido L-láctico presente en la muestra. La cantidad de NADH se determina por medio de la absorbancia a 340 nm.

Apéndice 3

Análisis por HPLC: información adicional

Antocianinas

Volumen de inyección: 50 µl (filtrado por 0.45 µm de tamaño de poro)

Flujo: 0.8 ml/min

Fase móvil A: agua / ácido fórmico / acetonitrilo 87:10:3 (v/v/v)

Fase móvil B: agua / ácido fórmico / acetonitrilo 40:10:50 (v/v/v)

Tiempo de adquisición: 45 minutos

Post-time: 5 minutos

Gradiente de elución:

Tiempo (min)	Fase móvil A (% v/v)	Fase móvil B (% v/v)
0	94	6
15	70	30
30	50	50
35	40	60
41	94	6

Identificación ($\lambda=518$ nm; malvidina cloruro como estándar externo):

Compuesto	Pico	Tiempo de retención (min)
Delfinidina-3-glucósido	1	7.92
Cianidina-3-glucósido	2	12.15
Petunidina-3-glucósido	3	14.03
Peonidina-3-glucósido	4	14.84
Malvidina-3-glucósido	5	16.01
Peonidina-3-acetilglucósido	6	17.89
Malvidina-3-acetilglucósido	7	19.49
Peonidina-3-cumaroilglucósido	8	24.77
Malvidina-3-cumaroilglucósido	9	30.20

Fracción no antocianínica

Las muestras de vino secas se redisolviéron en 1.5 ml de fase móvil, y posteriormente se sonicaron y filtraron por 0.22 µm, quedando listas para su inyección.

Volumen de inyección: 10 µl

Flujo: 0.50 ml/min

Fase móvil A: agua / ácido fórmico / acetonitrilo 97.9 : 2.0 : 0.1 (v/v/v)

Fase móvil B: agua / ácido fórmico / acetonitrilo 19.9 : 80.0 : 0.1 (v/v/v)

Tiempo de adquisición: 60 minutos

Gradiente de elución:

Tiempo (min)	Fase móvil A (% v/v)	Fase móvil B (% v/v)
0	95	5
1	95-75 (gradiente lineal)	5-25 (gradiente lineal)
30	75-70 (gradiente lineal)	25-30 (gradiente lineal)
35	70-45 (gradiente lineal)	30-55 (gradiente lineal)
40	45	55
45	45-20 (gradiente lineal)	55-80 (gradiente lineal)
50	20-95 (gradiente lineal)	80-5 (gradiente lineal)
55	95	5

Identificación:

Compuesto	Pico	Longitud de onda de identificación	Tiempo de retención (min)
Ácido gálico	1	280 nm	14.09
Catequina	2	280 nm	27.09
Ácido cafeico	3	230 nm	36.48
Ácido cumárico	4	230 nm	44.35
Quercetina	5	360 nm	51.89

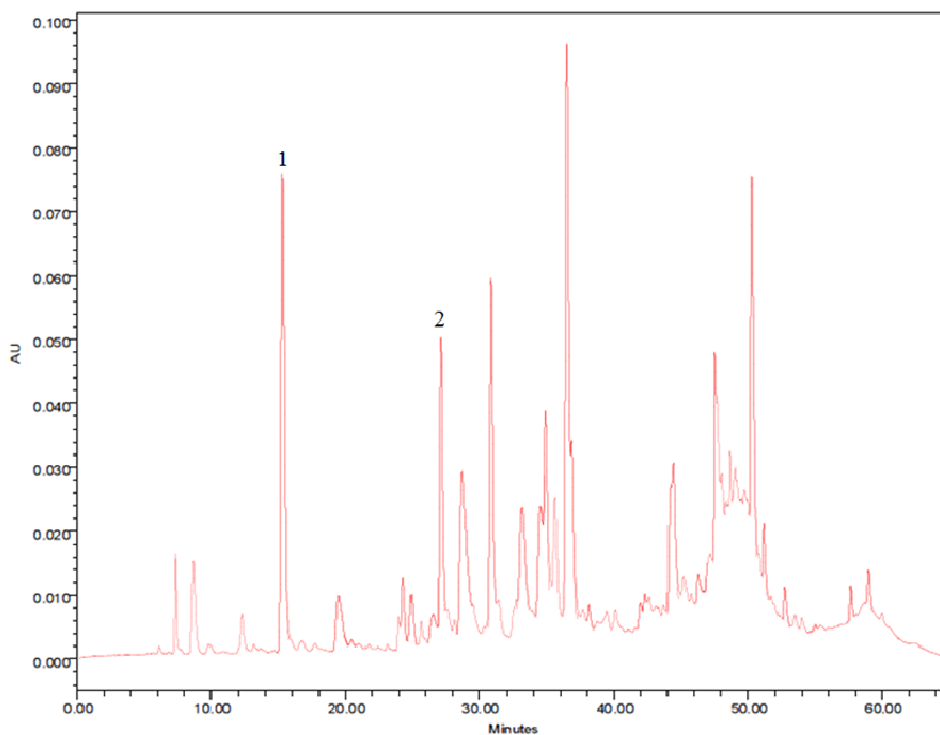


Figura adicional A: Cromatograma correspondiente a los compuestos representativos de ácidos hidroxibenzoicos y flavanoles determinados por HPLC a 280 nm: 1, ácido gálico; 2, catequina.

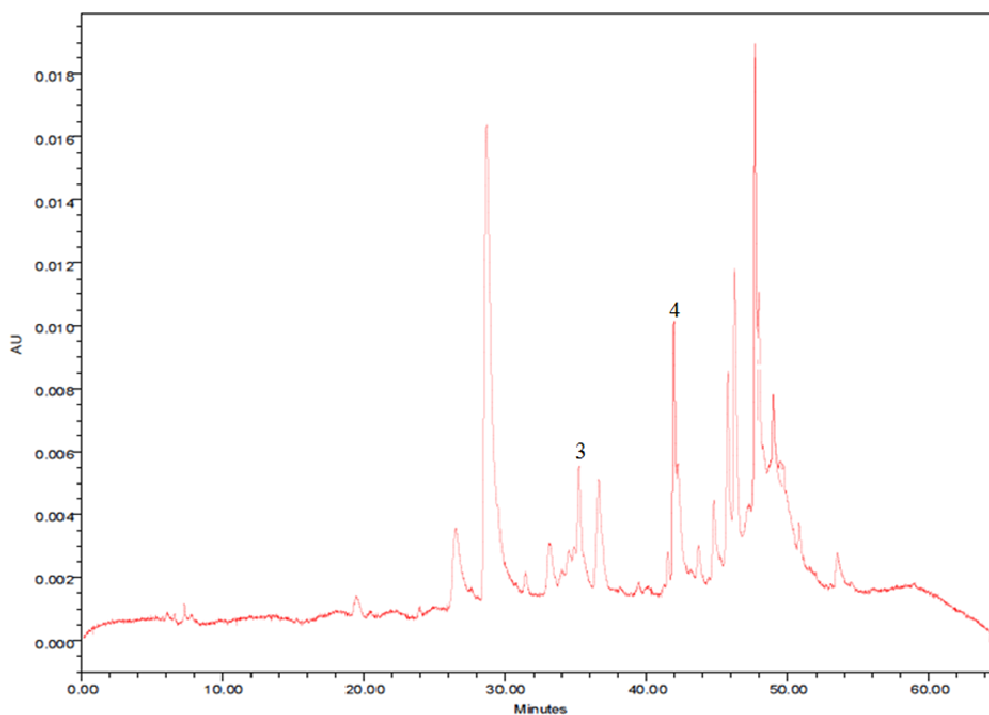


Figura adicional B: Cromatograma correspondiente a los ácidos hidroxicinámicos determinados por HPLC a 230 nm: 3, ácido cafeico; 4, ácido cumárico.

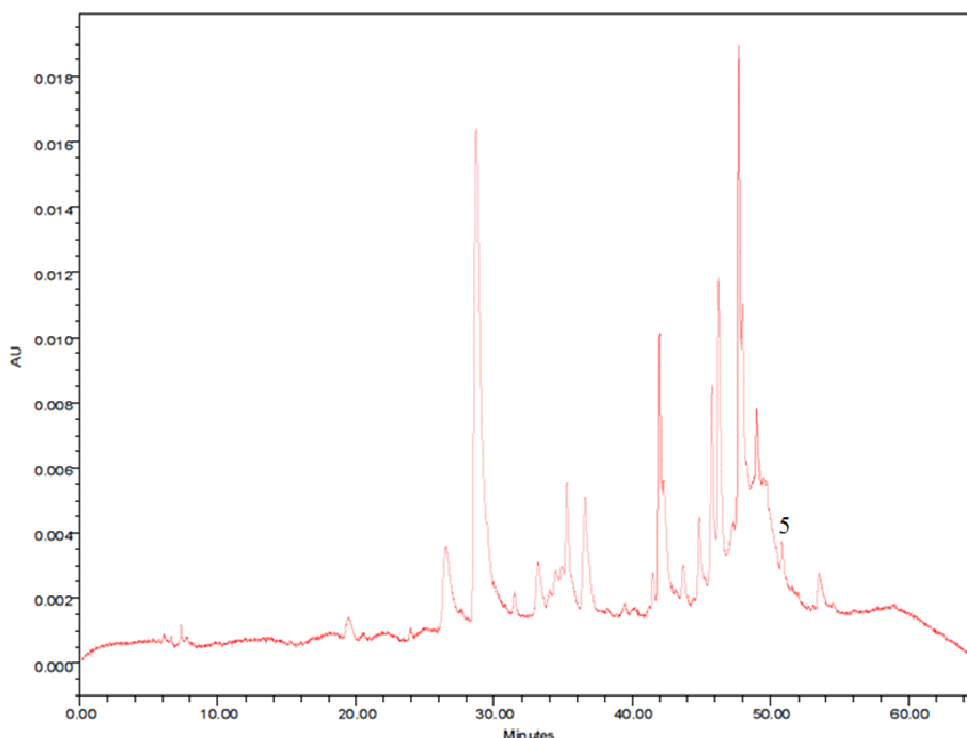


Figura adicional C: Cromatograma correspondiente al compuesto representativo de flavonoles, determinado por HPLC a 360 nm: 5, quercetina.

Aminoácidos y aminas biogénicas

Las aminoenonas identificadas por HPLC se forman por reacción de cada uno de los aminoácidos y aminas biogénicas con el agente de derivatización dietiletoximetilenmalonato (DEEMM).

Reacción de derivatización:

- 1.75 ml de buffer borato 1 M (pH 9.0)
- 750 µl de metanol
- 1 ml de muestra sin tratamiento
- 20 µl de estándar interno (ácido L-2-aminoadípico, 1 g/L)
- 30 µl de DEEMM.

(Factor de dilución total de la muestra: 3.55)

Agitar la mezcla en un vórtex e introducir en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos. Posteriormente, calentar a 70° C durante 2 horas para permitir la completa degradación del exceso de DEEMM y de los subproductos generados. Filtrar al vial, dejar enfriar y pinchar en HPLC.

Volumen de inyección: 50 µl

Flujo: 0.9 ml/min

Fase móvil A: 25 mM buffer acetato (pH 5.80-5.85), con 0.02 % de azida sódica

Fase móvil B: acetonitrilo / metanol 80:20 (v/v)

Tiempo de adquisición: 90 minutos

Post-time: 10 minutos

Gradiente de elución:

Tiempo (min)	Fase móvil A (% v/v)	Fase móvil B (% v/v)
0	90	10
30.5	83	17
65	60	40
73	28	72
78	18	82
82	0	100

Identificación:

Compuesto	Pico	Tiempo de retención (min)
Ácido aspártico	1	6.50
Ácido glutámico	2	8.81
Ácido L-2-aminoadípico	3	14.86
Glicina	4	23.74
Treonina	5	29.03
GABA	6	38.08
Prolina	7	40.92
Valina	8	51.20
Triptofano	9	57.31
Leucina	10	58.71
Ornitina	11	62.28
Lisina	12	65.17
Putrescina	13	76.46
Espermidina	14	79.06

Capítulo 5

Conclusiones generales

En el presente trabajo se estudió la producción de actividad PGasa por el hongo filamentoso *A. sojae* a partir de varios residuos agroindustriales en fermentaciones sumergidas. Se empleó la cepa de colección ATCC 20235, así como una cepa mutante descendiente de la anterior, seleccionada en estudios previos por su producción mejorada de actividad PGasa. La identificación de las variables relevantes y optimización de la producción enzimática se abordó mediante un enfoque tanto univariado como multivariado, empleando diseños experimentales. A su vez, se investigó el efecto del cambio de escala en la producción de actividad PGasa, analizándose diferentes variables de proceso involucradas en dicha producción. Por otro lado, a partir de un sobrenadante de cultivo y empleando técnicas cromatográficas se purificó y caracterizó bioquímica y cinéticamente la enzima responsable mayoritaria de la actividad PGasa producida por el microorganismo, con el fin de determinar el alcance de sus potenciales aplicaciones a nivel industrial. Finalmente, la enzima en cuestión se obtuvo a modo de preparado pectolítico, el cual se evaluó en relación a la mejora de ciertas etapas del proceso de elaboración de vino blanco y tinto, y también respecto a su capacidad de extracción de polifenoles y aminoácidos que impacten en el producto final.

A partir de los resultados obtenidos es posible arribar a las siguientes conclusiones generales:

- Los residuos provenientes de la industria citrícola resultaron ser los que rindieron mayor actividad PGasa. Además, la cáscara de soja resultó ser una fuente de carbono y energía atractiva para la producción de PGasa.
- En cultivos con cáscara de soja, el pH inicial del cultivo resultó ser la variable que afecta más significativamente a la producción enzimática. En torno a un pH inicial de 2.60, *A. sojae* se desarrolló en forma miceliar dispersa y se registró la mayor productividad volumétrica; 0.3-0.4 unidades de pH por encima o por debajo de dicho valor la productividad disminuye de forma importante. El pico de productividad observado podría ser consecuencia de los efectos opuestos de una inducción de la síntesis de PGasa/s a nivel transcripcional y a un crecimiento pobre debido a condiciones ambientales adversas. Cultivando *A. sojae* a un pH inicial en torno a 5, la morfología predominante es de pellets fúngicos. Medios de cultivo con partículas sólidas suspendidas favorecen el desarrollo del hongo en micelio disperso.

- La producción de PGasa fue escalada exitosamente de Erlenmeyer a biorreactores de tanque agitado, tanto con la cepa silvestre y empleando cáscara de soja, como con la cepa mutante y usando una mezcla de cáscaras de naranja y pomaza de damasco como fuente de carbono y energía. En ambos casos, la variable de proceso más influyente en los niveles de actividad PGasa fue la tensión de oxígeno disuelto (TOD). Establecer modificaciones en el flujo de aire automáticamente en respuesta a la TOD resultó ser la mejor estrategia para superar el problema de limitación por oxígeno sin comprometer el crecimiento microbiano y así obtener niveles elevados de actividad PGasa.
- La actividad PGasa producida por *A. sojae* en cultivos con cáscara de naranja es consecuencia principal de la acción de una endo-poligalacturonasa, la cual pesa 47 kDa, tiene un pI de 4.2 y cataliza la hidrólisis de su sustrato sin la necesidad de cationes divalentes.
- El K_M de la enzima pura frente a APG es uno de los más bajos reportados hasta la fecha, indicando una elevada afinidad por su sustrato.
- La gran estabilidad de la endo-PGasa en condiciones de acidez y su capacidad de hidrolizar sustancias pécticas en un rango de pH de 3.0 – 6.0 sugiere que es un biocatalizador apropiado para aplicaciones industriales de procesamiento de frutas y vegetales, tales como la extracción y clarificación de jugos. Asimismo, la industria vinícola es otro campo de aplicación potencial para la enzima.
- Un preparado pectolítico de *A. sojae* conteniendo mayoritariamente actividad PGasa promovió exitosamente el desfangado de mosto (pH = 3.35; T = 20° C) destinado a la elaboración de vino blanco, demostrando la utilidad de la enzima en procesos de clarificación.
- La PGasa de *A. sojae* podría emplearse para contribuir a acortar el tiempo de maceración fermentativa durante la elaboración de vinos tintos, ya que la aplicación del preparado pectolítico en esta etapa del proceso arrojó resultados consistentes con una extracción más rápida de materia colorante en comparación con vinificaciones control. Además, los vinos tintos elaborados empleando el preparado pectolítico de *A. sojae* presentaron cantidades significativamente mayores de ciertos polifenoles y aminoácidos, hecho que estaría directamente relacionado con una extracción mejorada de estos compuestos desde la uva hacia el vino debido a las actividades enzimáticas presentes en el preparado pectolítico.